

**Wirksamkeit von Antibiotika und Antibiotika-freien
Behandlungsmöglichkeiten bei Dermatitis digitalis
(Mortellarosche Erkrankung)**

Neue Wege zur Erhaltung der Klauengesundheit

von
Charlotte Kröger

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Wirksamkeit von Antibiotika und Antibiotika-freien
Behandlungsmöglichkeiten bei Dermatitis digitalis
(Mortellarosche Erkrankung)**

Neue Wege zur Erhaltung der Klauengesundheit

von
Charlotte Kröger
aus
Hamburg

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl

Mitbetreuung durch
Assoc. Prof. Dr. Dörte Döpfer, Ph.D.

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatte:r: Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl

Korreferent/en: Prof. Dr. Frank Ebel

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Stand der Wissenschaft und Technik	3
2.2	Dermatitis digitalis	4
2.2.1	Pathogenese	4
2.2.2	M-Stadien	6
2.2.3	DD Check App	8
2.2.4	Krankheitshistorie und Herdenstatus	10
2.2.5	Funktionelle Klauenpflege	12
2.2.6	Prävention	12
2.2.7	Schmerzhaftigkeit und Lahmheiten	16
2.2.8	Aktueller Stand der Behandlungsmethoden	19
2.2.9	Wirtschaftliche Konsequenzen	24
2.3	Nachweismethoden	26
2.3.1	Klinisches Bild	27
2.3.2	Biopsieentnahme	28
2.3.3	OTEB (Oral Treponeme Enrichment Broth)	30
2.3.4	Mikroskopischer Nachweis	30
2.3.5	DNA-Nachweis	32
3	Zielstellung	35
4	Tiere, Material und Methoden	36
4.1	Tiere und Betriebe	36
4.1.1	Haltungssysteme	36
4.1.2	Management der Klauengesundheit	37
4.1.3	Krankheitshistorie	38
4.1.4	Leistungs- und Reproduktionsdaten	39
4.1.5	Kriterien zur Aufnahme in die Studie	40
4.2	Versuchsaufbau	41
4.2.1	Evaluierung des Allgemeinzustandes des Tieres	41
4.2.2	Makroskopische Läsionsbeurteilung	43
4.2.3	Mikroskopie	48
4.2.4	Fotodokumentation	57

4.2.5	Behandlung.....	58
4.2.6	Zeitlicher Ablauf	61
4.2.7	Auswertung der makroskopischen Läsionsbeurteilung	64
4.2.8	Kombinierte Auswertung der Makroskopie und Mikroskopie	66
5	Ergebnisse	71
5.1	Datenerfassung.....	71
5.1.1	Auswertung der makroskopischen Läsionsbeurteilung	71
5.1.2	Dunkelfeldmikroskopie.....	88
5.1.3	Rasterelektronenmikroskopie	91
5.1.4	Kombinierte Auswertung der Makroskopie und Mikroskopie	93
6	Diskussion.....	118
6.1	Makroskopie.....	118
6.1.1	Auswahl der Studientiere	118
6.1.2	Auswahl der Medikamente.....	119
6.1.3	Biopsieentnahme	124
6.1.4	M-Score und Heilungsverlauf.....	124
6.2	Mikroskopie.....	126
6.2.1	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	126
6.2.2	Versilberung nach Warthin-Starry.....	126
6.2.3	Dunkelfeldmikroskopie.....	128
6.2.4	Kombinierte Auswertung der Makroskopie und Mikroskopie	129
6.3	Klinische Relevanz	131
6.4	Schlussfolgerungen	132
6.5	Ausblick.....	134
7	Zusammenfassung	135
8	Summary	137
9	Abbildungsverzeichnis.....	139
10	Tabellenverzeichnis.....	145
11	Anhang	146
12	Literaturverzeichnis.....	167

Alle anatomischen Termini wurden gemäß der 6. Auflage der Nomina Anatomica Veterinaria verwendet (NAV, 2017).

Abkürzungsverzeichnis

APDT	Antimicrobial Photodynamic Therapy
BCS	Body Condition Score
BDD	Bovine Dermatitis digitalis
BTA	biologisch technische(r) Assistent(in)
CTC	Chlortetracyclin
CI	Konfidenzintervall
DD	Dermatitis digitalis
DIM	Days in Milk
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ggr	geringgradig
HF	Holstein Friesian
hgr	hochgradig
kg	Kilogramm
LAMP	Loop Mediated Isothermal Amplification
LS	Locomotion Score
mgr	mittelgradig
MH	MortellaHeal
n	Anzahl
ODD	Ovine Dermatitis digitalis
OT	Objektträger
OTEB	oral treponeme enrichment broth
PCR	Polymerase Chain Reaction
r	Korrelationskoeffizient
ssp	Subspezies
Str.	Stratum
TAF	Thiamphenicol-Spray
ZKS	Zwischenklauenspalt
ZKZ	Zwischenkalbezeit

1 Einleitung und Problemstellung

Bovine Dermatitis digitalis (DD) ist eine international weit verbreitete Klauenerkrankung des Rindes. Die Krankheit wurde erstmals 1974 in Italien von Cheli und Mortellaro beschrieben (CHELI und MORTELLARO, 1974). DD ist gekennzeichnet durch erosive, schmerzhaftes Läsionen vor allem im plantaren Bereich von Ballen- und Kronsaum (DOPFER, 1994; RIEGLER, 2014). Die Läsionen finden sich aber auch im Zwischenklauenspalt (WILSON-WELDER et al., 2015b) oder bis proximal der Afterklauen. Des Weiteren sind DD-Läsionen in der Linea alba, der Kniefalte, dem Tarsus und an der Zitzenbasis beschrieben worden (EVANS et al., 2010). Neben den hauptsächlich betroffenen Hintergliedmaßen treten aber auch immer wieder Läsionen an den Vordergliedmaßen der erkrankten Tiere auf. Ein Großteil der betroffenen Kühe zeigt eine deutliche bis hochgradige Lahmheit.

DD tritt in allen Sparten rinderhaltender Betriebe auf. Mutterkuh-, Aufzucht- und Bullenmastbetriebe können mit der Problematik der DD in ebenso hohem Maße betroffen sein (ESCH, 2004), wiesmilchkuhhaltende Systeme ohne und mit Weidehaltung. Auf den Betrieben mit DD werden verschiedene Behandlungs- sowie Präventionsmethoden angewendet. Hierbei kommen neben präventiv eingesetzten Klauenbädern (HEMLING, 2017; HOLZHAUER et al., 2011; LAVEN und HUNT, 2002; SEYMOUR et al., 2000) therapeutisch sowohl antibiotische (BERRY et al., 2010; COATNEY et al., 2017) als auch nicht antibiotische topische Behandlungen auf den Läsionen zur Anwendung (KOFLEER et al., 2014; MERKATORIS et al., 2017; SCHULTZ und CAPION, 2013). Es hat sich jedoch gezeigt, dass bereits wenige Wochen nach einer klinisch als erfolgreich beurteilten Behandlung Rezidive auftreten können (BERRY et al., 2010; COATNEY et al., 2017).

In der ökologischen Landwirtschaft ist der Einsatz von Antibiotika stark reglementiert. Um den geforderten ökologischen Status eines Rindes, dessen produktiver Lebenszyklus länger als ein Jahr ist, aufrecht zu erhalten, dürfen drei Krankheitsbehandlungen mit chemisch-synthetischen allopathischen Medikamenten pro Tier und Jahr nicht überschritten werden (KOOPMANN, 2005). Krankheitsprävention ist hier von besonders großer Bedeutung. Aus diesem Grund ist es unerlässlich, stetig nach neuartigen sowie nachhaltigen Behandlungsmethoden

zu suchen, welche den Antibiotikaeinsatz minimieren, langfristig das geforderte Tierwohl unterstützen und keine Wartezeit haben.

Wenn eine Therapieform ohne Antibiotikum bei der Behandlung von DD eine vergleichbare Reduktion der Erregerlast wie eine Antibiose zeigt, sollte diese alternative Therapieform genutzt werden, um einen spürbaren Einfluss auf die Reduktion des Antibiotikaeinsatzes im Rahmen der Behandlung von Klauenerkrankungen zu gewährleisten (BERRY et al., 2010). Dieser Aspekt ist gerade bei den Klauenerkrankungen elementar wichtig, da behandelte Klauen durch den direkten Kontakt mit der Gülle eine Einschleppung von Antibiotika in die Umwelt nach sich ziehen und dieser Gefahrenpunkt durch Alternativen berücksichtigt wird (ESCH, 2004). Zudem kommen mit Antibiotika topisch behandelte Klauen in der Ruhephase mit dem Euter in Kontakt, wodurch Kontaminationen von Euterhaut und Milch wahrscheinlich sind (CRAMER und JOHNSON, 2015; GOMEZ et al., 2012; READ und WALKER, 1998).

Langfristig ist zudem eine Therapieform gefragt, welche effektiv und schnell mit der Erkrankung einhergehende Schmerzen eliminiert. Die heutigen automatisierten Stallsysteme sind darauf ausgelegt, dass gesunde Tiere über Bewegung artgerecht und ihren Bedürfnissen entsprechend mit Futter und Wasser versorgt werden (WIEDENHÖFT, 2005). Lahmende Kühe, welche Schmerzen haben, suchen die Funktionsbereiche für Futteraufnahme, Milchabnahme und Komfortverhalten seltener auf, wodurch es zu Verzerrungen der Zeitabläufe in den Funktionsbereichen kommt. Eine effektive, schmerzreduzierende Therapieform ohne Wartezeit auf die Milch, welche auch für größere Tierzahlen umsetzbar ist, ist somit auch ein wesentlicher Beitrag zum Tierwohl (WIEDENHÖFT, 2005).

2 Literaturübersicht

2.1 Stand der Wissenschaft und Technik

Das internationale Symposium und die internationale Konferenz zu Lahmheiten beim Wiederkäuer (International Symposium and International Conference on Lameness in Ruminants) findet seit 1976 alle zwei Jahre weltweit statt. Infektiöse ebenso wie nichtinfektiöse Klauenerkrankungen, automatische Lahmheitsdetektion, Präventionsmaßnahmen sowie Genomanalysen für einen möglichen Zuchtfortschritt und Optimierung von Haltungsbedingungen des jeweiligen Landes beschäftigen Wissenschaftler, Tierärzte, Klauenpfleger und Landwirte nahezu täglich (ALSAAOD und BÜSCHER, 2009; BRUMMELMAN et al., 2013; KRULL et al., 2014). Je nach Haltungsbedingungen, Klauenpflegeintervall und Leistungsniveau einer Herde kommen unterschiedliche Lahmheitsursachen und einhergehende Klauenerkrankungen zum Tragen (ALLEN et al., 2013; CRAMER et al., 2008; MIGUEL-PACHECCO et al., 2013).

Die internationale Abstimmung der Terminologie von Klauenerkrankungen ist von dringend notwendig. International harmonisierte Definitionen wurden in dem ICAR-Klauen-Gesundheitsatlas veröffentlicht (EGGER-DANNER et al., 2015). In diesem Atlas werden 27 Klauenerkrankungen erfasst und in die Untergruppen der infektiösen und nicht infektiösen Klauenerkrankungen eingeteilt. Zu den infektiösen Klauenerkrankungen gehören sowohl die digitale als auch die interdigitale Dermatitis und die Ballenhornfäule. Die nichtinfektiösen Klauenerkrankungen werden auch als Hornstörungen bezeichnet. Hierunter fallen die Sohlenblutungen, Sohlengeschwüre, Hornfissuren und alle weiteren Störungen im Bereich der Klauenhornkapsel.

Insbesondere für die Erkennung, korrekte Benennung und Behandlung der DD ist ein fundiertes Wissen über die Erscheinungsformen, etablierte Scoring-Schemata sowie die Möglichkeiten der korrekten Behandlung und Prävention unabdingbar.

2.2 Dermatitis digitalis

Dermatitis digitalis (DD) ist eine weltweit auftretende, infektiöse Klauenerkrankung des Rindes. DD-Läsionen treten überwiegend an der plantaren Fläche der Hintergliedmaßen, proximal des Zwischenklauenspalts am Übergang der behaarten Haut zum Ballenhorn auf. Klassisch für das akute Auftreten dieser Erkrankung sind runde, erosive, rötliche sowie meist schmerzhafte Läsionen. Unter Abschnitt 2.2.2 werden die unterschiedlichen Krankheitsstadien und deren Erscheinungsformen detailliert beschrieben. Des weiteren sind DD Läsionen in der Linea alba, der Kniefalte, dem Tarsus und an der Zitzenbasis beschrieben worden (EVANS et al., 2010; WERVEN VAN et al., 2016). DD ist auch bei Schafen, Ziegen, Rotwild und Elchen nachgewiesen worden (WILSON-WELDER et al., 2015a).

Durch die sehr unterschiedlichen Ausprägungsformen der einzelnen Krankheitsstadien haben sich neben dem wissenschaftlichen Terminus verschiedene regionale Bezeichnungen etabliert. Nordamerika spricht von „Hairy Heel Warts“, in Deutschland hört man oft den Begriff „Erdbeerkrankheit“ und länderübergreifend hat sich der Begriff "Mortellaro" oder "Mortellarosche Krankheit" etabliert (CHELI und MORTELLARO, 1974; DOEPFER, 2009; FIEDLER, 2012; RIEGLER, 2014).

2.2.1 Pathogenese

Die sogenannten vereinfachten Kochschen Postulate bezeichnen die Ursache-Wirkungs-Beziehung zwischen einem Erreger und einem Wirt (GRIMES, 2006).

Hierfür ist das universelle Vorhandensein des Erregers die erste Voraussetzung. Des Weiteren muss der Erreger isolierbar und in Kultur anzuzüchten sein. Die Verwendung des Isolates muss zur Wiederherstellung des Prozesses führen und anschließend soll der Erreger wieder isoliert werden können.

Wird einem Erreger ein definiertes Krankheitsbild zugeordnet, so verlangt diese Ursache-Wirkungs-Beziehung die Möglichkeit, auch experimentell das beschriebene Krankheitsbild mit dem vorliegenden Erreger hervorrufen zu können. Werden die Kochschen Postulate hierdurch erfüllt, gilt ein Keim als bewiesener Erreger einer spezifischen Krankheit.

Zahlreiche Forschergruppen beschäftigten sich bisher mit dem Erregerspektrum auf der Wundoberfläche und in den unterschiedlichen Gewebeschichten der DD-Läsionen (BERRY et al., 2010; BRANDT et al., 2016; CHOI et al., 1997; CORNELISSE et al., 1997; EVANS et al., 2016; KRULL et al., 2016; KULOW et al., 2017). Der Versuch, Rinder unter heute üblichen Haltungsbedingungen gezielt zu infizieren, scheiterte allerdings in den meisten Fällen. Lediglich unter forcierten Versuchsbedingung mit einer Vorschädigung der Haut durch Mazeration oder dem Abtragen des Stratum corneum konnten nach Wundinkubation mit isoliertem Erregermaterial DD ähnliche Läsionen induziert werden (GOMEZ et al., 2012; WILSON-WELDER et al., 2015b). Die Ursache-Wirkungs-Beziehung zur Erfüllung der Kochschen Postulate ist mit dem momentanen Wissensstand noch nicht abschließend geklärt, die Ursache von DD gilt weiterhin multifaktoriell mit einer essentiellen Beteiligungskomponente der Spirochäten.

Im feuchten Wundsekret der akuten, erosiven Läsionen der DD sind in Abklatschpräparaten unterschiedliche aerobe und anaerobe Kokken und Stäbchen nachweisbar.

Untersuchungen haben ergeben, dass neben diesen Begleitkeimen auf der Wundoberfläche *Treponema ssp.* in den veränderten Hautarealen nachweisbar sind (DOPFER et al., 1997; KLITGAARD et al., 2008; READ und WALKER, 1998). Diese beweglichen Bakterien werden nach heutiger wissenschaftlicher Ansicht als Leitkeim für das Erkrankungsbild der DD verantwortlich gemacht (DOPFER et al., 1997; GOMEZ et al., 2012; KOFLER et al., 2014; WILSON-WELDER et al., 2015b), da sich diese auch in den tieferen Schichten der veränderten Hautareale durch unterschiedliche Untersuchungsmethoden nachweisen lassen (CAPION et al., 2018; DOPFER et al., 1997). Die Interaktion zwischen den verursachenden Faktoren, den Wirt einschließend, der Spirochäten und einer unhygienischen Umgebung führt nach heutiger wissenschaftlicher Ansicht zur Infektion.

Neben dem Vorhandensein der Treponemen begünstigen viele weitere Risikofaktoren das Ausbrechen der DD. Zum einen bedingen Umgebungsfaktoren wie das "Einschleppen" der Erreger von außen (über Tiere etc.) in einen möglicherweise empfänglichen Betrieb das Infektionsrisiko und zum anderen wirtspezifische Faktoren wie das Immunsystem (WILSON-WELDER et al., 2015b). Ein mangelhafter Hygienestandard sowohl in der Futterlagerung als auch in der

Haltungsumwelt setzt die Tiere und ihr Immunsystem unnötig unter Stress. Stress als belastender Faktor findet sich in vielen Bereichen der Haltungsumgebung wieder und hat einen direkten Einfluss auf die Abwehrkräfte der Tiere. Überbelegung im Bezug auf Platz allgemein, Liegeboxen und Fressplatzangebot führt zu verlängerten Standzeiten, ungenügendes Futterangebot und somit zur sekundären Überbelastung der Klauen. Rangordnung, Witterung, mögliche Infektionen fordern das Immunsystem ebenso wie der fortwährende Kontakt mit Harnstoff aus dem Urin, Ammoniak und Feuchtigkeit welche zur Hautvorschädigung führen und eine Eintrittspforte für Erreger schaffen.

Treponemen gehören zu der Klasse *Spirochaetaceas* und sind gramnegative, korkenzieherähnlich gewundene, spiralisierte 6 bis 15 µm lange Erreger (RADOLF, 1996). Diese Bakterien können sich fortbewegen und gehören somit zu den stark invasiven Pathogenen. Durch seine äußere Membranstruktur mit sehr wenigen oberflächlichen Strukturproteinen entgeht ein Großteil der Erreger der Immunantwort des Wirts. Dennoch besitzen die Treponemen ausreichend Lipoproteine, um entzündliche Prozesse auszulösen (RADOLF, 1996).

Es wurden drei phylogenetische Gruppen der Treponemen im Speziellen mit der DD in Verbindung gebracht. Diese sind *Treponema denticola*, *Treponema phagedensis* und *Treponema medium* (ANKLAM et al., 2017).

DD ist eine sich langsam entwickelnde chronische Erkrankung, die durch länger anhaltende asymptomatische Phasen geprägt sein kann. Hierin ähnelt die Erkrankung der Syphilis des Menschen, welche durch *Treponema pallidum* hervorgerufen wird (RADOLF, 1996).

2.2.2 M-Stadien

Bei einem Ausbruch von DD kommt es zu offenen, erosiven, schmerzhaften Läsionen vor allem im Ballen- und Kronsaumbereich der Hintergliedmaße (DOPFER, 1994; KRULL et al., 2016; WILSON-WELDER et al., 2015b). Je nach Erscheinungsbild und Dauer der klinischen Erkrankung werden die Läsionen in fünf verschiedene Stadien (M0-M4 und M4.1) eingeteilt. Das M steht hierbei für die Bezeichnung „Mortellaro“. Dieses Klassifizierungssystem wurde von Döpfer 1994

etabliert, von Berry et al 2012 erweitert, von Krull et al verworfen, von Raven et al durch Benutzung eines anderen Systems ignoriert, von Evans et al 2017 diskutiert und es wird zusammen mit anderen Klassifikationssystemen international in wissenschaftlichen Studien angewendet.

Die Einstufungen reichen von M0 ohne jegliche Krankheitsanzeichen zu M1 mit ersten Anzeichen einer Erkrankung (DOPFER, 1994) in Form von umschriebenen Veränderungen mit granulomatöser Oberfläche bis 2 cm, aber ohne erkennbaren Höhenunterschied zur gesunden umgebenden Haut. M2-Stadium bezeichnet akute, erosive Schädigung der Haut, mit einer Größe von > 2 cm. Die chronische, proliferative und/oder hyperkeratotische Form, die mit M4 bezeichnet wird, kann wieder in Teilen in die akute Form übergehen. In diesem Falle spricht man von M4.1. M3-Stadien sind klinisch definiert als eine Form der Abheilung. Diese werden mit einem dunklen Wundschorf über der veränderten Hautoberfläche ohne Schmerzhaftigkeit beschrieben (DOEPFER, 2009).

Tabelle 1: Klassifizierung von Dermatitis digitalis nach Doepfer (DOPFER et al., 1997)

M-Stage	Beschreibung des M-Stages
M0	Intakte Haut, ohne Krankheitsanzeichen der Dermatitis digitalis.
M1	Frühe, kleine, umschriebene Veränderungen mit rötlich-grauer, granulomatöser Oberfläche bis \varnothing 2 cm. Ohne erkennbaren Höhenunterschied zur umgebenden, gesunden Haut. Vorgänger des akuten Stadiums.
M2	Akute, ulzerative (dunkelrote) oder granulomatöse (rötlich-graue) Schädigung der Zehenhaut mit einem Durchmesser von ≥ 2 cm. Kann schmerzhaft sein.
M3	Form der Abheilung 1-2 Tage nach lokaler Behandlung, dunkler Wundschorf deckt die ulzerative Läsion ab. Keine Schmerzhaftigkeit an der veränderten Hautoberfläche.
M4	Chronisches Stadium mit dyskeratotischen (überwiegend hyperkeratotisches Epithel) oder proliferativen Formen. Keine oder kaum Schmerzhaftigkeit an der veränderten Hautoberfläche.
M4.1	Chronische Läsion (M4) mit einer kleinen, integrierten M1 Läsion. Diese veränderte M4.1-Läsion kann wieder in die akute Form übergehen.

Um in Abhängigkeit von der gewählten Scoring-Methode, angewandt im Klauenstand, Penwalk oder Melkstand die Läsionen zu detektieren, muss das beschriebene M-Schema angepasst werden (Jacobs et al 2017, Oliveira et al 2017). In Abhängigkeit der Beinhygiene bietet sich bei der Läsionsbeurteilung an einem stehenden oder langsam gehenden Tier nicht die Möglichkeit, M1 und kleine akute und/oder chronische Läsionen zu erkennen. Grundsätzlich gibt es deshalb diverse Kategorisierungen zur Erfassung der DD Läsionen. So kann eine einfache Kategorisierung in DD vorhanden ja/nein oder eine Aufspaltung in DD nicht vorhanden, akute Läsion und chronische Läsion vorgenommen werden. Ein Dokumentationsprogramm für Befunde bei der Klauenpflege, das in skandinavischen Ländern eingesetzt wird, arbeitet mit einer Unterscheidung zwischen DD-Abwesenheit, jungen und späten Läsionen (CAPION et al., 2018). Zinicola et al sprechen von aktiven und inaktiven DD-Läsionen. Im Vergleich zu den M-Stadien könnte man auch von akuten und chronischen Läsionen sprechen. Daneben gibt es weitere Definitionen, die eine unterschiedliche Kategorisierung nach sich ziehen (READ und WALKER, 1998). Eine internationale Vergleichbarkeit und gemeinsames Verständnis wird über die Anwendung der M-Stadien und deren Zusammenfassung erleichtert.

Das Auftreten von DD-ähnlichen Läsionen wird auch in anderen Körperregionen des Rindes beschrieben. Neben Läsionen an der Dorsalfläche der Gliedmaße sind vermehrt Läsionen um die Afterklauen und kranial zwischen den vorderen Eutervierteln zu finden (EVANS et al., 2010; WERVEN VAN et al., 2016). In seltenen Fällen werden Läsionen auch so großflächig, dass diese vom Kronsaum bis weit über die Afterklauen reichen.

2.2.3 DD Check App

Die DD Check App ist eine neu entwickelte App zur einfachen Erfassung von DD Läsionen auf dem Betrieb (TREMBLAY et al., 2016). Sowohl auf einem Tablet als auch auf einem Smartphone mit iOS Betriebssystem kann diese Anwendungssoftware direkt im Stall am Tier genutzt werden. Dies geschieht bei den im betriebsindividuellen Turnus durchgeführten Herdenchecks während des Melkvorgangs, während eines Penwalks oder während der Klauenpflege (Solano et al 2017).

Für diese Arbeit wurde folgendermaßen verfahren. Nach der einmaligen Erfassung des Betriebes, dem aktuellen Datum, der möglichen Gruppennummer und dem durchführenden Beurteiler (Scorer) der Läsionen wurden die Identifikationsnummer und die jeweilige Gliedmaße des Tieres erfasst. Zur Läsionsbeurteilung lag das M-Schema (M0-M4.1) inklusive einer hinterlegten Übersicht vor. Diese Übersicht kann wahlweise als charakteristisches Läsionsbild oder als kurzer beschreibender Text angezeigt werden. Zusätzlich zu der Beurteilung der M-Stadien war die Erfassung chronischer Merkmale, wie Hyperkeratose und Proliferation vorgesehen. Auch das Fehlen einer chronischen Veränderung konnte aufgezeichnet werden.

Angegliedert an die Erfassung der Daten war die Option der umgehenden statistischen Auswertung. Diese graphisch oder tabellarisch dargestellte Auswertung konnte benutzerabhängig M-Stadien, einen einzelnen Tag, einen definierten Zeitraum oder eine Betriebsauswahl umfassen (TREMBLAY et al., 2016). Über die graphische Darstellung der Entwicklung der M-Stadien auf einem Betrieb konnten schnell, unkompliziert und direkt vor Ort Aussagen über den momentanen Verlauf einer Therapie, eines Interventionsprogramms oder einer prophylaktischen Maßnahme getroffen werden. Auch den Vergleich zwischen betriebsindividuell gewählten Untergruppen der Herde (zum Beispiel: Erstlaktierende, Frischmelkende, Altmelkende und belegtes Jungvieh) ermöglichte die DD Check App.

Neben der reinen Darstellung der M-Stadien konnte auch die Entwicklung der chronischen Merkmale der Läsionen über einen definierten Zeitraum ausgegeben werden. Über die Entwicklung der beurteilten chronischen Anzeichen der Läsionen kann zusätzlich eine Aussage getroffen werden, ob das vorliegende Maßnahmenpaket des Betriebes eine kontrollierte Krankheitssituation erhält oder ob die Herde auf einen erneuten Ausbruch mit akuten M2-Läsionen zusteuert (TREMBLAY et al., 2016). Bei einem prozentualen Anstieg der proliferativen Merkmale der beurteilten Läsionen, bewegt sich die Krankheitssituation auf ein Vorstadium in Richtung eines Ausbruchs akuter M2-Läsionen zu.

Die leichte Handhabung der DD Check App sowie die übersichtliche und eingängige Darstellung der statistischen Auswertung der Betriebssituation machte diese App zu einem wichtigen Werkzeug für die Studie. Landwirte können proaktiv anstatt reaktiv sein, indem sie DD in einer Herde mithilfe dieser App steuern. Die DD Check App dient als Beispiel dafür, wie Technologie Wissen und Ratschläge der

Veterinärepidemiologie zur Verfügung stellt, um diese komplexe Krankheit zu überwachen, zu kontrollieren und zu verhindern.

Das ABC-System (MANSKE et al., 2002) ist eine Art der Datenerfassung, die sich allerdings auf Papier oder in Klauenmanagementprogrammen abspielt. Die Datenanalyse bleibt jedoch deskriptiv und wendet keine automatisierten, statistischen Modelle an.

2.2.4 Krankheitshistorie und Herdenstatus

Für die Beurteilung der Klauengesundheit des Einzeltieres sowie des Herdenverbandes ist eine fortwährende, zeitlich nachvollziehbare Dokumentation von Klauenbefunden notwendig. Hierbei werden alle vom physiologischen Zustand der Klaue abweichenden Befunde erfasst (siehe 4.2.2.1.1). Die im zeitlichen Ablauf zusammengestellten Daten zeigen einerseits akute Erkrankungen und den Verlauf bei Einzeltieren auf, ermöglichen andererseits aber auch eine retrospektive Bearbeitung der Betriebssituation hinsichtlich des Auftretens und Verlaufs von Erkrankungen. Betriebsindividuell können so das Klauenpflegeintervall, Präventivmaßnahmen gegen infektiöse Klauenerkrankungen, sowie die Fütterung und mögliche Haltungsfehler analysiert und optimiert werden.

Laut Doeffer (2009) und Gomez et al (2015) können die erkrankten Kühe bei einer bekannten Krankheitshistorie entsprechend der erfassten M-Stadien (siehe 2.2.2) in drei Gruppen, Kuh-Typ 1, 2 und 3 unterteilt werden. Durch diese Klassifizierung der Einzeltiere kann zwischen akut neu erkrankten, chronisch infizierten und klinisch gesunden Tieren in einer Herde unterschieden werden. Diese Einteilung ist sowohl von großem züchterischen Interesse als auch von grundlegender Bedeutung, um den Infektionsdruck anhand der Ausprägungsrate auf dem Betrieb objektiv beurteilen zu können (DOEPFER, 2009). Die zu behandelnden Kühe werden auf dem jeweiligen Betrieb gemäß ihres zuvor erfassten Krankheitsverlaufs wie folgt eingeteilt:

Tabelle 2: Beschreibung der Erscheinungsformen der Kuh-Typen (DOEPFER, 2009)

Kuh-Typ	Beschreibung
Kuh-Typ 1	Ein Tier, das keine akuten M2-Läsionen entwickelt. M1 oder M4 sind möglich
Kuh-Typ 2	Ein Tier, das eine akute M2-Läsion entwickelt und anschließend für einen langen Zeitraum frei von akuten DD- Anzeichen ist. (Der lange Zeitraum hängt von dem Beobachtungsintervall der jeweiligen Studie ab, aber er kann von mehreren Monaten bis Jahren reichen.)
Kuh-Typ 3	Ein Tier, das wiederholte Episoden mit akuten M2-Läsionen in einem definierten Zeitraum zeigt. (Dieses Zeitintervall kann auch lediglich 10-14 Tage betragen.)

Einhergehend mit der Kuhtypen-Einstufung in drei unterschiedliche Erkrankungsbilder kann auch die Herde insgesamt und als Gesamtheit kategorisiert werden. Abhängig von dem prozentualen Anteil der auf dem Betrieb detektierten Läsionen wird die Herde in eine Typ 1 (<20% M2-Läsionen), Typ 2 (21-49% M2-Läsionen) oder Typ 3 (>50% M2-Läsionen) Herde eingestuft. Angestrebt ist entweder eine völlige Freiheit von einem Befall mit DD oder aber die Erlangung des Status einer Typ1-Herde. Dies steht für eine Herdensituation, in der die Krankheit durch gutes Management unter Kontrolle ist und keine nennenswerten wirtschaftlichen Verluste verursacht. Bereits Vermunt und Greenough geben eine jährliche Inzidenz von 10 % lahrenden Kühen in der Herde als Maximum an, bis zu dem die entstehenden Kosten sich noch in einem akzeptablen Rahmen halten. Sie weisen aber darauf hin, dass in Zukunft wohl bereits bei einer 5 % igen Prävalenz einer bestimmten Krankheit eine Herdenuntersuchung anzustreben ist (VERMUNT und GREENOUGH, 1997). Diese Toleranzgrenzen sind individuell vom Herdenmanagement abhängig (GOMEZ et al., 2014).

2.2.5 Funktionelle Klauenpflege

Ein Großteil der Klauenpflege wird an sogenannten Kipp- oder Durchtreibbeständen durchgeführt. Dies ermöglicht eine sichere Fixierung des Rindes im Fangrahmen, eine verlässliche Unterstützung des Tieres mit Bauch- und Brustgurten sowie ein mechanisches Aufheben der distalen Gliedmaße für die Klauenpflege.

Die funktionelle Klauenpflege basiert auf fünf Arbeitsschritten, die die physiologische Stellung und Form der Rinderklaue wiederherstellt (TOUSAAINT RAVEN, 1998). Nach Korrektur der Klauenlänge sowie der Sohlendicke in den ersten beiden Schritten, folgt das Ausschneiden der Hohlkehlungen an Innen- und Außenklaue. Im vierten und fünften Arbeitsschritt werden mögliche Defekte aus der Belastung genommen und anschließend versorgt (FIEDLER et al., 2000). Die medikamentöse sowie mögliche Verbands-Behandlung von DD-Läsionen gehört zu der angesprochenen Versorgung von Defekten. Jeder landwirtschaftliche Milchviehbetrieb arbeitet mit einem betriebsindividuellen Klauenpflegeintervall. Je nach Bodenbeschaffenheit, Fütterung und auftretenden Klauendefekten wird ein bis viermal pro Jahr ein Herdenschnitt durchgeführt.

2.2.6 Prävention

Anfang 2016 wurde ein 5-Punkte-Plan zur Kontrolle der DD von sieben europäischen Klauenexperten erarbeitet. Dieser wurde in Anlehnung an einen Maßnahmenkatalog zur betrieblichen Mastitiskontrolle entwickelt. Der neu entwickelte Präventionsplan zielt darauf ab, die Verbreitung von DD in Milchviehbetrieben zu reduzieren, indem Managementaufgaben in 5 Schwerpunktbereichen eingeführt werden (GELDHOF et al., 2017). Der Fokus liegt hier jeweils auf der:

- externen Biosicherheit um DD und betriebsfremde Erreger aus dem Betrieb heraus zu halten,
- internen Biosicherheit um den Infektionsdruck innerhalb der Herde so gering wie möglich zu halten,
- frühe Erkennung, Dokumentation und Behandlung von Klauenerkrankungen
- regelmäßige Klauenreinigung und –Desinfektion zur Prävention von Neuerkrankungen
- Bestimmung und Überwachung von gesetzten Zielen.

Das Wort Prävention beinhaltet neben der Allgemeinbedeutung der vorbeugenden Maßnahme drei unterschiedliche Formen (PSCHYREMBEL et al., 1994).

- **Primäre Prävention:** Ausschaltung von als gesundheitsschädigend geltenden Faktoren (Risikofaktoren)
- **Sekundäre Prävention:** Sicherstellung frühestmöglicher Diagnose und Therapie von Erkrankungen durch Vorsorgeuntersuchungen
- **Tertiäre Prävention:** Begrenzung bzw. Ausgleich von Krankheitsfolgen (Rehabilitation)

Wichtig für die Beschreibung dieser Einteilung ist die Unterscheidung zwischen Betrieben, in denen Tiere bereits an DD erkrankt sind / waren, und noch von DD freien Betrieben.

Die Betriebe ohne DD-Problematik legen den Fokus ausschließlich auf die primäre und sekundäre Prävention in ihrem Betrieb. In den primären Bereich fällt hier die externe Biosicherheit mit kontrolliertem Personenverkehr sowie einem geschlossenen Betriebssystem ohne Zukauf von Zuchtvieh anderer Betriebe und ohne Ausstellen von Tieren auf Ausstellungen. (GELDHOF et al., 2017). Ebenso ist die Nutzung von Gemeinschaftswerkzeugen im Nutztierbereich wie beispielsweise ein Klauenstand, ein Geburtshelfer, eine Viehwaage oder ein Viehwagen ein möglicher Übertragungsweg von Treponemen und sollte bei von DD freien Betrieben vermieden werden (BLOWEY et al., 2017). Auf jedem von DD betroffenen Betrieb kann eine eigene Gruppe an Subspezies der Treponemen nachgewiesen werden. Über die zuvor beschriebenen Maßnahmen soll der Eintrag von Erregern fremder Betriebe unterdrückt und der Kontakt mit infizierten Tieren verhindert werden, um den erstrebenswerten Zustand eines von DD freien Betriebes zu erhalten.

Auf Betrieben mit einer bekannten DD-Problematik gibt es hingegen konkrete Empfehlungen für Präventionsmaßnahmen entsprechend des 5-Punkte-Plans, die international zum Tragen kommen (GELDHOF et al., 2017).

Die **primäre Prävention** umfasst die Ausschaltung möglicher Risikofaktoren. Diese sind insbesondere in der Haltungsumwelt zu finden. Sowohl die Aufstallung mit den zur Verfügung stehenden Lauf- und Liegeflächen, das Platzangebot pro Tier, die Möglichkeit der Fütterung entsprechend dem tierindividuellen Leistungsbedarf als

auch die klimatischen Bedingungen der Haltungsumwelt bergen ein Risiko, die DD-Prävalenz eines Betriebes zu erhöhen. Die Erhaltung sauberer, griffiger und ausreichend breiter Laufgänge im Zusammenspiel mit trockenen, gepflegten und in ausreichender Zahl vorhandenen Liegeboxen (Liegebox/Tier-Verhältnis min. 1/1) fällt unter die primären Präventionsmaßnahmen (HAGEN und MÜLLING, 2012). Die kontinuierliche Laufgangreinigung und Liegeboxenpflege führt zur Reduktion typischer Erregerreservoirs, wie feuchte, dunkle und sauerstoffarme Schmutzkrusten oder Kothaufen und zum Abtrocknen der Klauen. Über die Laufgangreinigung wird auch eine Reduktion des direkten Kontakts zum Harnstoff aus dem Urin und zu Keimen aus dem Kot erreicht. Der ständige Kontakt mit Feuchtigkeit, Keimen und Harnstoff greift die natürliche Hautbarriere an und zerstört diese. Bei einer ungenügenden Laufgangreinigung und Boxenhygiene wird viel Ammoniak aus der Gülle in die Umgebung abgesetzt und greift besonders Schleimhäute zusätzlich an. Gut gepflegte und in ausreichender Zahl vorhandene Liegeboxen animieren die Kühe dazu sich abzulegen (WIEDENHÖFT, 2005). Hierbei kommt es neben der Möglichkeit der Abtrocknung der Klauen auch zur Entlastung der distalen Gliedmaße. Klimabedingte Stressoren wie beispielsweise stehende Hitze über den Tieren, müssen mit der forcierten Luftbewegung über ausreichend dimensionierte und korrekt platzierte Ventilatoren minimiert werden (ALLEN et al., 2013; SCHRANNER, 2015).

Eine weitere Möglichkeit, gesundheitsschädigende Faktoren einzuschränken, ist der Einsatz von keimreduzierenden Klauenbädern mit Bioziden (FIEDLER et al., 2013b; HEMLING, 2017; KLEIMINGER, 2012; SEYMOUR et al., 2000), bei denen es nicht um die Therapie von DD-Läsionen geht. Die Anwendung von Klauenbad-Lösungen ist gesetzlichen Regelungen unterworfen. Dabei wird im Zusammenhang mit DD grundsätzlich zwischen der Behandlung bzw. Therapie von Läsionen mit Arzneimitteln und der allgemeinen Veterinärhygiene an den Füßen mit registrierten Bioziden unterschieden. Der präventive Einsatz von Klauenbädern gilt der Erregerreduktion an der Klaue, der Pflege der Haut sowie der Erhaltung des inaktiven Krankheitsgeschehens nach erfolgter Herdenbehandlung für eine möglichst lange Zeitspanne (GELDHOF et al., 2017). Einen ähnlichen Effekt, jedoch primär fokussiert auf die Reinigung der Klaue und des Zwischenklauenspalts, sollen Klauenwaschanlagen erzielen (MAIER et al., 2013; SILBERNAGL, 2012).

Die Heritabilität von Klauengesundheit wird ebenfalls als vielversprechend angesehen, auch hinsichtlich der DD (STOCK und AGENA, 2012). Die Herangehensweise DD über die Zucht positiv zu beeinflussen und einen Zuchtwert für Klauengesundheit zu etablieren, ist ein vielversprechender Ansatz (SCHOLEY et al., 2013).

Bei der **sekundären Prävention** liegt der Focus auf der regelmäßigen Durchführung von Vorsorgeuntersuchungen, um proaktiv eingreifen zu können, sobald in einer zuvor kontrollierten Situation erste akute Krankheitsstadien der DD wieder auftreten (DOEPFER et al., 2012). Im Rahmen von sogenannten Penwalks - regelmäßigen gezielten Untersuchungen der Gliedmaßen von möglichst im Fressgitter fixierten Rindern durch Begehung der Stallabteile, Läsionsbeurteilungen im Melkstand oder in freilaufenden Kleingruppen (3-5 Tiere), kann in kurzer Zeit ein einigermaßen sicherer Überblick über die Herdensituation bezüglich der Ausprägung von akuten und chronischen Läsionen, sowie DD-freien Tieren, gewonnen werden (CRAMER et al., 2018; FIEDLER et al., 2015; KULOW et al., 2017; MERKATORIS et al., 2017; RELUN et al., 2017). Cramer gibt je nach durchgeführter Evaluation zwar eine etwas niedrigere Sensitivität (<70%), aber dafür eine deutlich höhere Spezifität (>93%) für das Auffinden von DD-Läsionen an. Abhängig von dem Ort der Durchführung können die Läsionen zuvor gewaschen und unter Zuhilfenahme einer externen Lichtquelle aus einem Abstand von 30 cm bis 1,8 m am stehenden Tier beurteilt werden. Hierbei können M2-Läsionen > 1-2 cm sowie M4-Läsionen sicher erkannt werden. Im Gegensatz dazu ist abhängig vom Trainingszustand des Beurteilers die Detektion und Unterscheidung von M1 und M0-Läsionen sowie die sichere Differenzierung zwischen M4 und M4.1-Läsionen nicht gegeben. Für einen kontinuierlichen Überblick über die Herdensituation sollten diese Vorsorgeuntersuchungen alle 7-14 Tage durchgeführt werden (TREMBLAY et al., 2016).

Eine genauere Untersuchung mit entsprechend verlässlicher Aussage zu den diversen DD-Stadien ist im Klauenstand möglich. Im Rahmen einer routinemäßigen Klauenpflege, alle vier bis sechs Monate, kann die Erfassung zusätzlich ebenfalls der Überwachung dienen. Hier ist auch die Möglichkeit der Dokumentation von Tieren möglich, die frei von klinischen DD Symptomen sind (M0).

Der **tertiären Prävention** kommen der Ausgleich sowie die Begrenzung der Erkrankungsfolgen zu. Keinen weiteren Zukauf aus fremden, mit DD betroffenen Betrieben mehr zu tätigen und die gesamte Remontierung über die im eigenen Betrieb aufgezogene Nachzucht zu realisieren, sind eine Möglichkeit, Erkrankungsfolgen zu minimieren. So werden keine neuen, betriebsfremden Erregerstämme mehr in die Herde eingebracht. Chronisch kranke Tiere, deren Läsionen nicht dauerhaft in ein klinisch DD freies Stadium überführt werden können, sollten geschlachtet und durch gesunde, betriebseigene Nachzucht ersetzt werden.

Ein weiterer Ansatz, die Folgen der Erkrankung einzudämmen und langfristig möglicherweise zu eliminieren, ist eine Impfung (CARTER, 2016). Da Treponemen jedoch nicht intrazellulär zu finden sind, die Fähigkeit haben, sich zu enzystieren und eine spezielle äußere Membran besitzen, sind die Erreger nur sehr schwer für das Immunsystem zu erreichen. Die klinische Belastbarkeit der bisher vorhandenen Impfstoffe gegen DD ist noch kein durchschlagender Erfolg zur Elimination oder effektiven Reduktion der DD-Problematik auf betroffenen Betrieben (CARTER, 2016). Ein neuer wissenschaftlicher Ansatz zu einer stallspezifischen Vakzine ist gegen die Begleitflora der Treponemen auf den Läsionen gerichtet und empfiehlt diesen im Jungviehbereich, um die Treponemen grundsätzlich durch Schutz der Hautbarriere fernzuhalten (MARCATILI et al., 2016).

Entscheidend für die Umsetzung aller Präventivmaßnahmen ist die Erstellung eines Planes nach einer Risikoanalyse, der im Rahmen der betriebseigenen Möglichkeiten unter Einbeziehung aller beteiligten Personen, der Praktikabilität sowie der Ökonomie eine positive Wirkung auf die Herdengesundheit im Hinblick auf DD hat (HAGEN und MÜLLING, 2012).

2.2.7 Schmerzhaftigkeit und Lahmheiten

Für die Beurteilung des Gangbildes und den Schweregrad einer Lahmheit, kann der **Locomotion Score** (LS) verwendet werden (SPRECHER et al., 1997). Bei dem LS wird das Gangbild der Tiere auf gerader Strecke und gleichbleibendem Untergrund in 5 Grade eingeteilt. Das Hauptkriterium ist hierbei neben der Kopfhaltung und der Gliedmaßenbelastung die Krümmung der Rückenlinie.

Tabelle 3: Locomotion Score nach Sprecher (SPRECHER et al., 1997)

Locomotion Score (LS)

Grad	Beschreibung
1	Gerade Rückenlinie im Stand und in der Fortbewegung
2	Tiere dieser Gruppe weisen eine gerade Rückenlinie im Stand, aber eine Krümmung dieser während der Fortbewegung auf.
3	Tiere dieser Gruppe zeigen sowohl im Stehen als auch bei der Fortbewegung eine gekrümmte Rückenlinie und senken den Kopf in der Bewegung ab.
4	Das Tier zeigt über die bereits genannten Merkmale (3) hinaus deutliche Unregelmäßigkeiten im Gangbild.
5	Zusätzlich zu den unter 3 beschriebenen Punkten kommt es zu einer vollständigen Entlastung einer Gliedmaße.

Die überwiegende Zahl der mit M2-Läsionen betroffenen Kühe zeigt eine deutliche Lahmheit, welche mit einem LS von 3-5 beurteilt werden kann (RAUNDAL et al., 2017; RIEGLER, 2014; SHEARER et al., 2013). Diese Bewegungsnoten weisen auf ein offensichtlich schmerzhaftes Geschehen hin. Der Locomotion Score ist ein gutes Werkzeug, lahrende Tiere aus einer Herde zu selektieren, jedoch kein geeignetes Bewertungsschema um alle akuten M2-Läsionen zu detektieren.

Für ein umfassendes Bild der vorliegenden unterschiedlichen Krankheitsstadien auf dem Betrieb oder innerhalb einer Tiergruppe ist die Evaluierung der Läsionen in einem Klauenstand während der Bestandsklauenpflege das sicherste Verfahren (CRAMER et al., 2018; FIEDLER, 2012). Für einen Überblick über eine Tiergruppe und ein kontinuierlich erneuertes Bild der Läsionsprävalenz eignen sich aber auch sogenannte Penwalks. Hierbei werden die Tiere entweder im Fressgitter fixiert, im Melkstand beurteilt oder in Kleingruppen an einer Person vorbei getrieben (CRAMER et al., 2018; KULOW et al., 2017; MERKATORIS et al., 2017). Unabhängig von dem Ort der Durchführung ist das Evaluationsergebnis abhängig von den Lichtverhältnissen, dem Untergrund sowie der Sauberkeit der distalen Gliedmaße der Tiere (CRAMER et al., 2018).

Neben der melkenden Herde kann auch bereits das Jungvieh DD-Läsionen aufweisen (GOMEZ et al., 2014). Die Behandlung von Klauenerkrankungen im Jungviehbereich steht oft nicht im Focus des Betriebes, da selten geeignete Vorrichtungen zur adäquaten Behandlung vorhanden sind. Schmerzhafte

Klauenläsionen führen bei Milchkühen zu einer verminderten Rangposition und signifikant verkürzten Aufenthaltsdauern am Futtertrog (WEIGELE et al., 2018). Diese Studienergebnisse können auch auf das Jungvieh übertragen werden. Von DD betroffenes Jungvieh fällt oft aufgrund der Schmerzen in der Entwicklung zurück. Es kann sich in der Rangfolge und in der Konkurrenz um Futter- und Liegeplatz nicht länger gegen die gesunden Tiere behaupten.

Der systemische, antibiotische Therapieansatz mit Tetracyclin, Ceftiofur oder Penicillin beinhaltet ebenso wenig wie die antibiotische Spraybehandlung mit Tetracyclinen eine schmerzlindernde Komponente (CUTLER et al., 2013).

Einige der nicht antibiotischen Behandlungsmöglichkeiten (2.2.8.2) weisen eine zusätzliche schmerzlindernde Komponente auf (FIEDLER et al., 2015; SCHULTZ und CAPION, 2013).

Nach welcher Zeitspanne sich die Tiere im Anschluss an eine Behandlung allerdings wieder lahmheitsfrei fortbewegen, sollte hinsichtlich der eingesetzten Behandlungsform entscheidend sein (RAUNDAL et al., 2017; SCHULTZ und CAPION, 2013). Langfristig ist sicherlich eine Therapieform gefragt, welche sowohl effektiv als auch schnell die mit der Erkrankung einhergehenden Schmerzen beseitigt. Dies ist ein Ziel hinsichtlich eines positiven Beitrags zum Wohl der Nutztiere (Brentrup und Adams 1990; Rebhun et al. 1980; Nutter und Moffitt 1990).

Die heutigen automatisierten Stallsysteme sind darauf ausgelegt, dass gesunde Tiere artgerecht und ihren Bedürfnissen entsprechend mit Futter und Wasser versorgt werden (WIEDENHÖFT, 2005). Lahmende Kühe, welche Schmerzen haben, suchen die Funktionsbereiche für Futteraufnahme, Milchentzug und Komfortverhalten seltener auf (MIGUEL-PACHECCO et al., 2013; WEIGELE et al., 2018). Eine effektive, schmerzreduzierende Therapieform ohne Wartezeit auf die Milch, welche auch für größere Tierzahlen umsetzbar ist, ist somit auch ein positiver Beitrag zum Wohl der Rinder (COATNEY et al., 2017; SHEARER et al., 2013; WIEDENHÖFT, 2005).

Je schneller über eine Therapie die Schmerzen der DD genommen werden, desto schneller zeigen die betroffenen Kühe ihr Normalverhalten und werden in den Herdenverband reintegriert (RAUNDAL et al., 2017; WEIGELE et al., 2018). Dies ist für einen wirtschaftenden Betrieb von elementarer Wichtigkeit.

2.2.8 Aktueller Stand der Behandlungsmethoden

Grundsätzlich lassen sich zwei Therapieansätze zur Behandlung der DD herausstellen. Unterschieden wird hier zwischen antibiotischen und nicht antibiotischen Produkten sowie topischen oder systemischen Anwendungsmöglichkeiten.

2.2.8.1 Antibiotische Behandlungsmethoden

Eine der heutigen Standardbehandlungen bei der Diagnose „Dermatitis Digitalis“ ist eine Antibiotika-Anwendung (BERRY et al., 2010; COATNEY et al., 2017; CUTLER et al., 2013; RIEGLER, 2014). Hierbei wird wahlweise metaphylaktisch ein verschreibungspflichtiges chlortetracyclin- oder oxytetracyclinhaltiges Spray oberflächlich aufgebracht oder eine systemische Antibiose mit einmaligem (RIEGLER, 2014) oder mehrmaligem Injizieren von Penicillin oder Ceftiofur durchgeführt (EVANS et al., 2016). Zudem gibt es ein für die Behandlung von DD zugelassenes Thiamphenicol-Spray (HOLZHAUER et al., 2017b) (TAF-Spray, Eurovet Animal Health BV, Bladel, Niederlande bzw. Albrecht GmbH, Aueldorf, Deutschland). Gewöhnlich wird nach der Spraybehandlung kein Verband angelegt, eine Wiederholungsbehandlung wird laut Herstellern nach 12 Stunden bzw. ein- bis zweimal täglich empfohlen (Engemycin, MSD Tiergesundheit / Intervet International GmbH, Unterschleißheim, Deutschland; Cyclo spray Eurovet Animal Health BV, Bladel, Niederlande; TAF Spray). Nach der Behandlung soll das Tier 12 Stunden trocken aufgestellt werden (Engemycin). Die Spraybehandlung zieht bei der Anwendung am Rind laut Hersteller keine Wartezeit auf Milch nach sich. Bei systemischer Behandlung muss die Wartezeit des angewendeten Arzneimittels eingehalten werden.

Bei diesen Behandlungsarten kommt es zu zwei wesentlichen Problemen. Das antibiotische Spray wird zwar direkt auf die Läsionen aufgebracht, aber nicht abgedeckt bzw. fixiert. Sowohl bei der Behandlung im Klauenstand (BERRY et al., 2010; FIEDLER et al., 2015; KOFLER et al., 2014), als auch bei einem Besprühen

der Klauen im Melkstand kommt der behandelte Fuß fast unmittelbar nach dem Aufbringen des Medikaments wieder auf den Boden (COATNEY et al., 2017; GOMEZ et al., 2012; READ und WALKER, 1998). Hierbei kommt der besprühte Läsionsbereich mit dem Kot auf den Laufgängen in Kontakt. Da die überwiegenden DD-Läsionen am Übergang vom Ballen- zum Fesselbereich lokalisiert sind, kommt dieser Hautbereich in der lastaufnehmenden Phase der Fortbewegung mit dem Boden in Berührung. Über die Feuchtigkeit auf den Laufgängen und den fortwährenden Kontakt mit der Oberfläche kommt es somit zu einer Einschleppung des oberflächlich aufgetragenen Antibiotikums in die Gülle (CRAMER und JOHNSON, 2015). Neben dem Eintrag in die Umwelt wird durch den Kontakt mit dem Boden auch die Kontaktzeit zwischen Läsion und Antibiotikum reduziert, ein gewünschter Behandlungseffekt bleibt aus (EVANS et al., 2016; KLAWITTER et al., 2016). So können Resistenzbildungen sowohl bei der Bakterienflora direkt am Rinderfuß als auch in der Gülle induziert werden (EBERT et al., 2014). Bei vereinzelt auftretenden Erkrankungen, sowie kleinen Läsionen, handelt es sich grundsätzlich um Kleinstmengen des eingesetzten Antibiotikums. Mittlerweile ist allerdings die internationale Prävalenz der DD auf bis zu 74% in Ontario, USA, in den Milchviehbetrieben gestiegen (CARTER, 2016; CRAMER et al., 2008; WILSON-WELDER et al., 2015b) und auf einzelnen Betrieben sind bis zu 90% der Tiere erkrankt. Dies führt zu einer deutlich höheren Belastung der Gülle und einer einhergehenden Umweltbelastung (WIEDENHÖFT, 2005). Bei einer systemischen Antibiose wird pro Tier eine deutlich höhere Antibiotikamenge eingesetzt, um einen ausreichend hohen sowie langen Wirkstoffspiegel im betroffenen Gewebe zu erzeugen (RIEGLER, 2014). Nach systemischer Applikation kann es ebenfalls zu einem Eintrag in die Umwelt kommen, da beispielsweise Penicillin zum Teil unmetabolisiert über den Harnapparat ausgeschieden wird.

2.2.8.2 Nichtantibiotische Behandlungsmethoden

Neben den antibiotischen Therapieformen der DD haben sich in der Praxis unterschiedliche nicht antibiotische Behandlungsmethoden etabliert. Ähnlich den antibiotischen Behandlungsmethoden kommen primär Spray- und Verbandsbehandlungen zum Einsatz.

Mikronisierte Kupfer- und Zinkchelate werden als freiverkäufliche Biozide in verschiedenen Darreichungsformen angewendet (Produktnamen - HoofFit Bath, Liquid, Gel und Repiderma Spray, Fa. Intracare BV, Veghel, The Netherlands). Der Hersteller gibt für die bis zu 3 µm kleinen Chelate sowohl eine bakterizide als auch eine die Wundheilung fördernde Wirkung an. Das gelförmige Produkt hat eine Zulassung als Tierarzneimittel ohne Wartezeit in den Niederlanden. Mehrere Studien zeigen eine positive Wirkung dieser Produktformulierung bei der topischen Anwendung auf akuten M2-Läsionen (HOLZHAUER et al., 2011; JORRITSMA et al., 2016; LAMMERS et al., 2016). Ein positiver Behandlungseffekt wird hier an der Ausbildung von M3 Stadien festgemacht. Eine Verlaufskontrolle über einen längeren Zeitraum nach der Behandlung hat jedoch nicht stattgefunden.

Als Arzneimittel mit einem Tag Wartezeit für Milch und essbares Gewebe wird keratolytisch wirkende Salicylsäure in Pastenform eingesetzt (Novaderma, Fa. WDT, Garbsen, Deutschland). Salicylsäure wirkt nach lokaler Anwendung auf der Haut in Konzentrationen über 2% keratolytisch (MULLER et al., 1998). Der Wirkungsmechanismus beruht hauptsächlich auf der Spaltung von Disulfid- und Wasserstoffbrücken des Keratins. Die Keratinozytenproliferation bleibt unbeeinflusst. Zusätzlich entfaltet die Substanz antiseptische, juckreizlindernde und entzündungshemmende Wirkungsqualitäten. Diese findet vor allem in Deutschland, Dänemark und Österreich einen verbreiteten Einsatz im Rahmen einer drei bis fünftägigen Verbandsbehandlung von M2 und M4-Läsionen. Neben der Bildung von M3 Läsionen wird vor allem ein schmerzlindernder Effekt 10-20 Minuten nach Aufbringung der apothekenpflichtigen Paste beschrieben. Vor allem bei hochgradig schmerzhaften M2-Läsionen ist dies im Hinblick auf gefordertes Tierwohl eine hervorzuhebende Wirkung (FIEDLER et al., 2015; KOFLER et al., 2014; SCHULTZ und CAPION, 2013). Belastbare Langzeitprognosen sind durch Nachkontrollen an Tag 28 bis 30 nach der Anwendung möglich (CAPION et al., 2018; CAPION et al., 2013). Neben der rein klinischen Betrachtung der DD-Läsionen haben Capion et al. (2018) wiederholt Stanzbiopsien aus den erkrankten Bereichen entnommen und beschreiben einen reduzierenden bis eliminierenden Effekt der Salicylsäure auf Treponemen (CAPION et al., 2018; SCHULTZ und CAPION, 2013). Ein weiterer Vorteil der Behandlungsform mit Salicylsäure ist neben der nachgewiesenen Schmerzreduktion (SCHULTZ und CAPION, 2013) eine entzündungshemmende

Komponente über den Zusatz von Methylsalicylat (KOFLER et al., 2014). Durch die übliche Fixation mittels Verband kommt es zu keinem direkten Kontakt des Produkts mit der Umwelt und die Salicylsäure kann nach der Verbandsabnahme kontrolliert entsorgt werden.

Die Verwendung von Polyurethan Wundauflagen (Mortella Heal, Dr. Kenndoff GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland) zur Wundabdeckung kann nachweislich eine klinische Abheilung des DD-Krankheitsbildes hervorrufen (FIEDLER et al., 2013a; FIEDLER et al., 2015). Die Wundauflage wird mit Hilfe eines gepolsterten Verbandes am erkrankten Fuß über einen definierten Zeitraum von 12-14 Tagen fixiert. Durch die Fixation mittels Verband kommt es zu keinem direkten Kontakt des Produkts mit der Umwelt, die Wundauflage aus Polyurethan kann nach der Verbandsabnahme kontrolliert entsorgt werden, das arzneimittelfreie Produkt ist freiverkäuflich und hat keine Wartezeit. Die Wundauflage hat über ihre Struktur einen polsternden und somit dämpfenden Effekt auf das darunterliegende Gewebe (FIEDLER et al., 2013a; FIEDLER et al., 2015). Über die Möglichkeit, direkten, punktuellen Druck breitflächig auf das gesunde Umgebungsgewebe abzuleiten, beinhaltet auch diese Therapieform eine schmerzlindernde Komponente. Das spezielle Polyurethangewebe der Wundabdeckung wirkt nach dem Prinzip der feuchten Wundheilung und imitiert in der Heilungsphase den Wundschorf. In Schweinemodellen war die Epithelialisierung von frischen Operationswunden unter Polyurethanfilmen doppelt so schnell, wie die verglichenen offenen und trockenen Wunden. Körpereigenes Wundwasser wird zwischen Pflaster und Wundoberfläche angesammelt. Es dient als Reaktionskammer für die Zellen des Immunsystems und als Transportmedium für körpereigene Regenerationsprozesse in der Kollagensynthese, im Rahmen der physiologischen Wundheilung. In humanmedizinischen Studien lag unter dem Polyurethanpflaster an Tag drei nach Behandlungsbeginn eine größere Anzahl an Makrophagen im Vergleich zur offenen Wundheilung vor. An Tag fünf hingegen nahm die Anzahl an proliferativen Zellen zu und gleichzeitig die Anzahl der Entzündungszellen ab (BRYAN, 2004). Über die besondere Struktur kann die Polyurethan-Wundauflage einen Teil der überschüssigen Wundflüssigkeit absorbieren. Hierdurch kommt es zu einer Steigerung der Konzentration von Metalloproteinasen, proteolytischen Enzymen und Wachstumsfaktoren in dem verbleibenden Wundsekret. Dies ist ein

wichtiger Aspekt, um die Wundheilung sowohl in der exsudativen Phase, als auch in der proliferativen Reepithelialisierungsphase optimal zu unterstützen (BRYAN, 2004). Das Ergebnis einer erfolgreichen Behandlung stellt sich als zarte, neue Hautoberfläche dar (FIEDLER et al., 2015). In der Studie von Fiedler et al., 2015 wurde aber auch die Notwendigkeit einer sehr umsichtigen Verbandstechnik herausgestellt. Da die vom Hersteller vorgesehenen Verbände für 14 Tage an dem zu behandelnden Fuß verbleiben sollen, besteht die Gefahr des Einschneidens bei nicht fachgerechter Handhabung.

Einen ganz anderen Ansatz der antibiotikafreien Therapie wählte eine Arbeitsgruppe aus Brasilien. Sie setzte die Antimicrobial Photodynamic Therapie (APDT) in der Behandlung im Vergleich zu einem Tetracyclin-Spray bei akuten und chronischen DD-Läsionen ein (SELLERA et al., 2017). Diese Lichttherapie mit molekularem Sauerstoff soll über Radikalbildung zelluläre Strukturen zerstören, was einen bakteriziden Effekt haben soll. Das Ergebnis der Studie weist eine vergleichbare Wirkung der beiden gegeneinander getesteten Substanzen auf.

International finden Formalin- und Kupfersulfatbäder in der Klauenbadroutine noch eine weit verbreitete Anwendung (DOEPFER et al., 2013; HEMLING, 2017; JANSEN et al., 2017; JENNINGS et al., 2013; SEYMOUR et al., 2000). In Deutschland ist der Einsatz von Kupfersulfat verboten (siehe auch 2.2.5) und eine Anwendung des als kanzerogen eingestuften Formalins als Klauenbad nicht zugelassen. Ein oft unterschätztes Problem bei den Landwirten sind die gravierenden Folgen von Überdosierungen oder Fehlmischungen dieser Chemikalien (JENNINGS et al., 2013). Resultierende chemische Verbrennungen führen zu weitgehender Zerstörung der Haut, des Unterhautfettgewebes, und in schwerwiegenden Fällen auch von Sehnen, Knochen und Gelenken bzw. zur Zusammenhangstrennung von Kronsaum und Hornkapsel (DYSON et al., 2013).

Grundsätzlich handelt es sich bei den beschriebenen Anwendungen nicht um rein prophylaktische, keimreduzierende Anwendungen, die die innerbetriebliche Erkrankungssituation unter Kontrolle halten sollen, sondern um den Versuch einer Behandlung von M-Stadien. Dadurch heben sich diese Produkte in der Deklaration, Anwendung und Wartezeit klar von Präventivmaßnahmen und Bioziden (2.2.5) ab.

Wenn bei DD eine Therapieform ohne Antibiotikum eine vergleichbare Reduktion der Erregerlast im Gewebe zeigt, kann dies einen merklichen Einfluss auf den

Antibiotikaeinsatz im Rahmen der Behandlung von Klauenerkrankungen bieten (BERRY et al., 2010). Im Hinblick auf das eingeführte Antibiotikamonitoring auf landwirtschaftlichen Betrieben in Deutschland kann hier entscheidend Einfluss auf den Verbrauch von antibiotikahaltigen Arzneimitteln genommen werden. Nur bei Einhaltung der geforderten Richtlinien und Schwellenwerte werden die produzierten tierischen Produkte (Fleisch, Milch, Häute) zur Vermarktung frei gegeben (BLEUEL, 2010). Auch der beschriebene Eintrag von Antibiotika in die Umwelt würde mit alternativen Behandlungsverfahren reduziert werden (ESCH, 2004). Dieser Aspekt ist gerade bei der infektiösen Klauenerkrankung der DD sehr wichtig, da die behandelten Füße sowohl in der Bewegung mit dem Kot bzw. der Gülle, als auch in der Ruhephase mit dem Euter in Kontakt kommen (CRAMER und JOHNSON, 2015; GOMEZ et al., 2012; READ und WALKER, 1998).

2.2.9 Wirtschaftliche Konsequenzen

Die wirtschaftlichen Auswirkungen der DD zeigen sich auf sehr vielfältige Weise sowohl in der innerbetrieblichen Situation als auch bei übergreifenden Vermarktungsstrategien. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die tatsächliche Prävalenz von DD-Läsionen auf dem eigenen Betrieb oft unterschätzt wird und die tatsächlichen Kosten deutlich höher liegen (OLIVEIRA et al., 2017).

Grundsätzlich werden Klauenerkrankungen deutschlandweit, je nach statistischer Auswertung und zugrundeliegender Daten, zu einer der drei häufigsten Abgangsursachen von Milchkühen gerechnet (WIEDENHÖFT, 2005). DD hat je nach Betrieb einen Anteil von bis zu 70% der Klauenläsionen (CRAMER et al., 2008). Demnach kann also gesagt werden, dass ein großer Teil der Abgänge aufgrund von Klauenproblemen mit DD assoziiert ist.

Auf den betroffenen Betrieben ist meist nicht nur die melkende Herde und die Gruppe der Trockensteher betroffen, sondern auch das Jungvieh zeigt bereits ab einem Alter von 6 Monaten schmerzhafte M2-Läsionen, (GOMEZ et al., 2014). Je nach Aufstellungsart des Jungviehs stellt der fortwährende Kontakt mit dem Kot der älteren Tiere über eine gemeinsame Schieberentmistungsbahn oder ungenügend

gereinigte Stiefel des Stallpersonals, welche auch im Bereich des Milchviehs getragen werden, einen Risikofaktor dar.

Mit DD befallenes Jungvieh führt auf dem Betrieb zu einem deutlich erhöhten Arbeitsaufwand für die Behandlungsleistung der akut erkrankten Tiere, die nötigen Präventionsmaßnahmen, sowie der verlängerten Aufzuchtphase und einem damit einhergehenden späteren Erstkalbealter (CAPION et al., 2018; GELDHOF et al., 2017; GOMEZ et al., 2014). Innerhalb der betroffenen Aufzuchtgruppe können weitere Tiere infiziert werden und erkranken, diese können aufgrund der Schmerzen in der Entwicklung zurückfallen. Verminderte Tageszunahmen führen zu einer verlängerten Aufzuchtdauer und verursachen neben den benötigten Medikamenten und der Arbeitszeit auf dem Betrieb zusätzliche Kosten. Jungkühe, die über die gesamte Aufzuchtphase nicht mit DD infiziert waren, zeigen höhere Einsatzleistungen in der ersten Laktation, einen besseren Erstbesamungserfolg und retrospektiv höhere Tageszunahmen in der Aufzuchtphase (GOMEZ et al., 2014). Ein schwerer Befall mit DD stellt besonders bei reinen Aufzuchtbetrieben ein Problem dar, da selten notwendige Treibe- und Fixierungsvorrichtungen für Präventionsmaßnahmen und Behandlungen der Jungtiere vorhanden sind.

Schmerzhafte M2-Läsionen bei Deckbullen sind ein weiterer die Reproduktion betreffender Aspekt (Borrero and Córdoba 2017). Bei schmerzhaften Prozessen an den Hintergliedmaßen verlieren auch verlässliche Deckbullen ihre Sprung- bzw. Deckfreudigkeit. Werden entsprechende Läsionen nicht frühzeitig erkannt und gezielt behandelt, kommt es in der Herde zu Deckausfällen und langfristig zu erhöhten ZKZ und möglichen Abgängen melkender Kühe auf Grund von scheinbarer Unfruchtbarkeit.

Betroffene Tiere in der melkenden Herde fallen ebenfalls in der Rangordnung ab, im Herdenverband zurück und verbringen deutlich weniger Zeit am Futtertrog (WEIGELE et al., 2018). Die Ausübung von Komfortverhalten wie das Aufsuchen der Kuhbürste, das Abfragen der zugeteilten Milchleistungsfuttermittelstation an der Kraftfutterstation sowie die Gesamtaktivität gegenüber lahmheitsfreien Tieren sinkt signifikant ab (MERKATORIS et al., 2017; PAVLENKO et al., 2011). Die Entwicklung der Melkfrequenz bei automatischen Melksystemen in Abhängigkeit von Lahmheitsinzidenz wird ebenfalls beeinflusst. Kühe mit einem abweichenden Locomotion Score ($LS \geq 3$) gehen signifikant seltener zum Melken als lahmheitsfreie

Kontrollkühe in der gleichen Laktationsphase, die Milchleistung ist verringert (MIGUEL-PACHECCO et al., 2013). Neben einer auf Dauer geringeren Milchleistung zeigen einfach zu identifizierende, lahme Kühe auch einen einhergehenden verminderten Erstbesamungserfolg und eine korrelierend verlängerte Zwischenkalbezeit (ZKZ) im Vergleich zu nicht lahmen Kühen (WIEDENHÖFT, 2005). Bereits ab einem LS 3 konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen gesunden (LS 1) und nach der in der Studie genutzten Definition lahmen Tiere (LS 3) festgestellt werden (WEIGELE et al., 2018). Dies zeigt, dass bereits bei mgr. Lahmheit deutliche Unterschiede festzustellen sind.

Bei Direktvermarktung von Zuchtvieh, beim Verkauf von Exportrindern oder abgekalbter Rinder z.B. über Zuchtviehauktionen, kann DD zu den angesagten Mängeln vor Vertragsabschluss gehören und wirkt somit oft preismindernd. Bei dem negativen wirtschaftlichen Einfluss von Mortellaro auf Betrieben dürfen die entstehenden Kosten für den benötigten Tierarzt, den Klauenpfleger sowie für einzusetzende Medikamente und Verbandsmaterial nicht unterschätzt werden. Einen großen Kostenpunkt stellt hierbei auch das eingesetzte Betriebspersonal hinsichtlich der Arbeitszeit dar (BRONSEMA et al., 2014).

Bei der erläuterten Prävention (s. 2.2.5) kommen ähnliche Kostenpunkte zum Tragen. Eine regelmäßige Klauenpflege der gesamten Herde, Produkte für präventive Klauenbäder, passende Treibevorrichtungen sowie ausreichend Personal und Arbeitszeit müssen in die Kostenkalkulation mit einbezogen werden. Somit ist sowohl die Behandlung als auch die Prävention auf dem Betrieb hinsichtlich der entstehenden Kosten zu berücksichtigen (EVANS et al., 2016). Hagen und Mülling, 2012 beziffern die tatsächlichen wirtschaftlichen Verluste bei einem Sohlengeschwür auf 405 Euro direkte und 445 Euro indirekte Kosten pro Erkrankung je Tier (HAGEN und MÜLLING, 2012).

2.3 Nachweismethoden

Die Herangehensweise an die möglichen Nachweismethoden von Erregern, histologischen Veränderungen, Genanalysen und Scoring-Methoden sind vielfältig.

2.3.1 Klinisches Bild

Wie bereits unter 2.2.2 beschrieben, hat die Erkrankung DD verschieden ausgeprägte Krankheitsstadien, welche klassischer Weise an der plantaren Fläche der Hintergliedmaße auf Höhe der Fesselbeuge auftreten.

Eine klinische Beurteilung einer Läsion bietet immer nur eine rein oberflächliche Betrachtungsmöglichkeit der Erkrankung ohne weitere invasive Maßnahmen. In die Beurteilung der Erkrankungssituation fließt neben der rein optischen Beurteilung auch die olfaktorische Empfindung mit ein. Ein Vorteil der Läsionsbeurteilung am Tier ist der haptische Eindruck. Mögliche Verhärtungen im Gewebe oder vermehrte Wärme bei einer Schwellung können direkt erfasst werden.

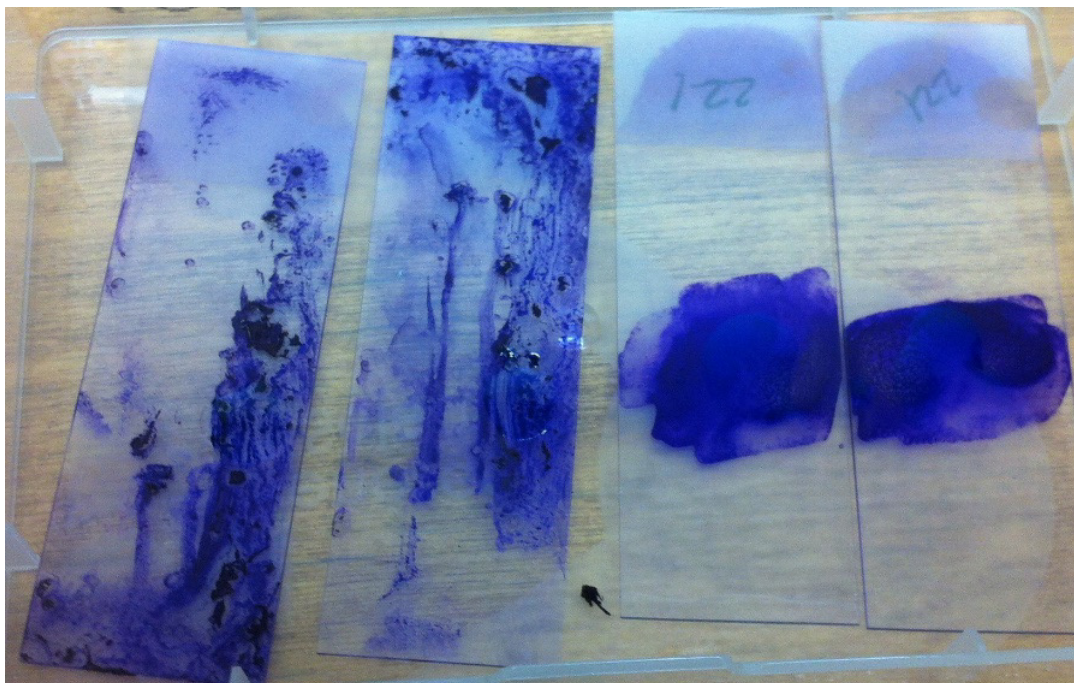


Abbildung 1: Kristallviolett-Färbungen eines ausgestrichenen, hitzefixierten Abklatschpräparats des Wundbelags (links im Bild) und einer OTEB-Probe des Transportmediums (rechts im Bild) auf jeweils zwei Objektträgern

Abklatschpräparate von der Wundoberfläche bieten eine weitere oberflächliche Beurteilungsmöglichkeit des klinischen Bildes ohne invasives Vorgehen. Hierfür wird das Wundsekret mit der kurzen Seite eines Objektträgers (OT) aufgenommen. Ein zweiter OT wird in entgegengesetzter Richtung über den ersten geschoben. Auf diese Weise wird die gewonnene Probe zwischen den beiden genutzten Objektträgern gleichmäßig verteilt. Die Hitzefixierung des Präparats mit einem Bunsenbrenner kann je nach Ausstattung direkt vor Ort oder später im Labor

erfolgen. Im Anschluss an die Fixierung folgt das Färben mit Kristallviolett für 1 Minute. Nach Abwaschen der überflüssigen Färbelösung und der Trocknung im Trockenblock, kann das Präparat unter dem Mikroskop betrachtet werden. In diesen Abklatschpräparaten kann die gesamte Begleitflora zu den Treponemen der Wundoberfläche dargestellt werden.

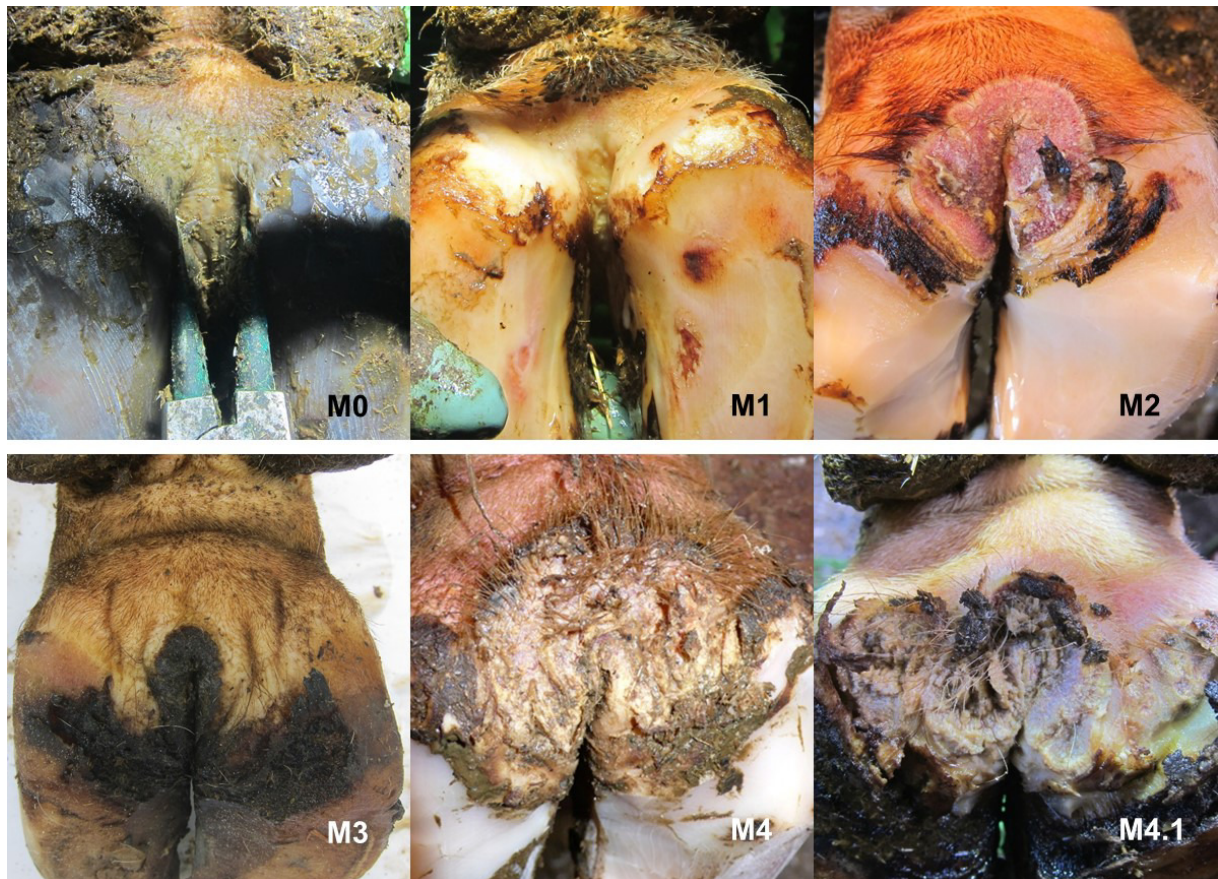


Abbildung 2: Darstellungen der M-Stadien

2.3.2 Biopsieentnahme

Nach der klinischen und der damit einhergehenden oberflächlichen Betrachtung der DD-Läsionen gibt es die Möglichkeit, Gewebeproben aus dem veränderten Bereich zu entnehmen. Dies eröffnet zum einen die Möglichkeit für histologische Untersuchungsschritte und zum anderen für weitergehende Genanalysen der enthaltenen Erreger. Die in diesem Bereich durchgeführten Studien unterscheiden sich wesentlich hinsichtlich des Entnahmezeitpunktes. Gewebeproben können nach der Tötung des Tieres entnommen werden und stellen zum Beispiel bei der

Entnahme am Schlachthof insbesondere organisatorische Anforderungen an die Umgebungshygiene und die Möglichkeit der Zuordnung einer abgetrennten distalen Gliedmaße zu einem Schlachtkörper (DOPFER et al., 1997; KULOW et al., 2017).

Entstammt die Biopsie einem Rind im Rahmen einer laufenden Untersuchung, erfordert die Entnahme einer Stanzbiopsie aus einem lebenden Tier neben einer gründlichen Reinigung des Fußes eine adäquate lokale Schmerzausschaltung vor der Entnahme (EIBERLE, 2010; GOMEZ et al., 2012). Im Anschluss an die Entnahme muss ein Verband angelegt werden, um einer Infektion der gesetzten Wunde vorzubeugen und damit einhergehend die Behandlung der untersuchten DD-Läsion (BORKERT et al., 2013; CAPION et al., 2018; CAPION et al., 2013). Die Biopsieentnahme aus DD-Läsionen bei einer größeren Tierzahl als Verlaufskontrolle eines Behandlungserfolgs wurde bisher erst vereinzelt in Studiendesigns integriert (CAPION et al., 2018). Dadurch wird es möglich, die Wirkung eingesetzter Arzneimittel auf Treponemen in tieferen Gewebeschichten der Haut zu untersuchen. Es bleibt also nicht bei der rein oberflächlichen, klinischen Betrachtung, um den Behandlungserfolg oder –misserfolg eines Produkts definieren zu können (CAPION et al., 2018; CAPION et al., 2013).

2.3.3 OTEB (Oral Treponeme Enrichment Broth)

Da *Treponema spp.* zu den mikroaerophilen Bakterien gehören, stellen sie besondere Anforderungen an ihre Kultivierungsbedingungen (RADOLF, 1996). OTEB-Medium ist ein anaerobes, flüssiges Kulturmedium, das von der MLUA (Fa. Milchwirtschaftliche Lehr- und Untersuchungsanstalt Oranienburg, MLUA Oranienburg, Deutschland) hergestellt wurde. Die Firma Anaerobe Systems (Morgan Hill, CA, USA) beschreibt OTEB in ihrer Produktbeschreibung (siehe 11) als ein komplexes Pepton-Hefeextrakt-Medium. Dieses enthält kurzkettige Fettsäuren und Kälberserum, womit notwendige Nährstoffe für die aus ihrem gewohnten Habitat entnommenen Treponemen bereitgestellt werden. Aufgrund des hohen Serumgehalts kommt es zu der charakteristischen, goldgelben Farbe des OTEBs. Die Bereitstellung eines anaeroben, nährstoffreichen Milieus im direkten Kontakt zu dem entnommenen Gewebe bietet den spiralisierten und beweglichen Bakterien die Möglichkeit, in dieses Medium auszuwandern und können somit über die Dunkelfeldmikroskopie nachgewiesen werden. Mit den annähernd perfekten Umgebungsbedingungen für Treponemen im OTEB, soll die Enzystierung im absterbenden Bioplat reduziert und das Auswandern der Erreger forciert werden. Das spezielle Medium dient zur Isolierung, Kultivierung oder auch Anreicherung von *Treponema*. Die Firma Anaerobe Systems empfiehlt die Subspezies *Treponema denticola* und *Treponema phagedensis* als Testkeim für die Evaluation des Mediums. Dies stellt das OTEB-Medium für die vorliegende Studie als hervorragend geeignetes Kulturmedium heraus, da diese Subspezies auch in den Läsionen der DD beschrieben werden.

2.3.4 Mikroskopischer Nachweis

Abhängig von dem vorliegenden Probenmaterial gibt es verschiedene Möglichkeiten, Treponemen mikroskopisch nachzuweisen. Ein mit einem Bunsenbrenner hitzefixiertes und eingefärbtes Abklatschpräparat der Wundoberfläche kann ebenso unter dem Lichtmikroskop auf die vorliegenden Erreger untersucht werden wie ein histologisches Schnittpräparat. Treponemen können in einem histologischen Schnitt über die Silberimprägnationsmethode sichtbar gemacht werden (RADOLF, 1996).

Die Versilberung nach Warthin-Starry oder nach Steiner sind zwei gängige Färbemethoden, um Spirochaeten anzufärben. In einem Gewebeschnitt kann so die vorliegende Eindringtiefe der Erreger sowie die Erregermenge beurteilt werden (DOPFER et al., 1997; KLITGAARD et al., 2008; KULOW et al., 2017). Eine ergänzende Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE Färbung) eines Folgeschnitts erleichtert die Orientierung im Gewebe und ermöglicht die Beurteilung der einzelnen Zellschichten sowie deren Reaktivität durch die Beurteilung der eingewanderten Zellen sowie der Bestimmung der mitoserate im Gewebe (DOPFER et al., 1997; LANG, 2013).

Doepfer und Muelling haben ein **Barriere-Modell** entwickelt, welches sich für die Evaluation der HE-Schnitte und die Beurteilung der Eindringtiefe der Treponemen sehr gut eignet. Im Barriere-modell wird von drei wesentlichen, aufeinander folgenden Barrieren ausgegangen, die einen Schutz zwischen der Umgebung und den ersten subkutanen Blutgefäßen bilden. Ausgehend von einer intakten Haut stellt das Stratum corneum eine erste Schutzschicht (Barrier I) gegenüber der Außenwelt dar. In der Auswertung histologischer Präparate kann diese Barriere oder aber die Zusammenhangstrennung bzw. der Verlust dieser Barriere bewertet werden. Kommt es zu einer Zusammenhangstrennung der obersten, abschilfernden Zellschichten, erleichtert dies den beweglichen Treponemen das Eindringen in den intrazellulären Raum. Treponemen schieben sich vorzugsweise zwischen den Zellen hindurch entlang der Zellkontakte. Lösen sich diese durch entzündliche Prozesse auf, können die Erreger leicht weiter in die Tiefe vordringen. Das Stratum spinosum stellt gemeinsam mit dem Stratum granulosum die zweite Barriere (Barrier II) dar. Die Basalmembran wird in dem vorliegenden Modell als abschließende, dritte Abgrenzung und Schutzeinrichtung gesehen (Barrier III). Je nach Schweregrad der Erkrankung und Tiefe der erosiven Hautveränderungen, kann im histologischen Präparat eine Zerstörung des physiologischen Zellkontakts bis über die Basalmembran hinaus vorliegen.

Lebendige Treponemen in einer Probe mit anaerobem Medium sind zu dünn, um mit einem konventionellen Lichtmikroskop visualisiert werden zu können. In diesem Fall können die spiralförmigen Bakterien über das Verfahren der Dunkelfeldmikroskopie sichtbar gemacht werden. Treponemen rotieren schnell um ihre eigene Achse, beugen und strecken sich. Diese Bewegungen reflektieren unter dem

Dunkelfeldmikroskop das einfallende Licht und machen die Bakterien sichtbar (RADOLF, 1996).

Sowohl die flüssigen OTEB-Proben, als auch die Gewebeproben eröffnen zusätzlich die Möglichkeit, elektronenmikroskopische Untersuchungen auf Treponemen durchzuführen. Im Anschluss an die Probenaufbereitung wird die Probenoberfläche mit Goldpalladium bespattert um eine metallische Probenoberfläche zu erzeugen. Die anschließende Rasterelektronenmikroskopie erschafft ein Bild der Oberfläche eines Untersuchten Präparats durch den Beschuss mit einem Elektronenstrahl. Das Bild wird über den Grad der Ablenkung der einzelnen Elektronen erstellt. Diese Technologie ermöglicht so die reine Darstellung einer Oberfläche mit einer bis zu 15.000-fachen Vergrößerung der Probe.

2.3.5 DNA-Nachweis

Real time PCR (Polymerase Chain Reaktion) ist in vielen Laboratorien eine etablierte Standardmethode, um spezifische DNA nachzuweisen. Über einen thermozyklischen Prozess wird die gesuchte DNA in 40 aufeinander abfolgende Zyklen amplifiziert. Jeder erfolgreiche Reproduktionsprozess des gesuchten DNA-Abschnitts beinhaltet eine gekoppelte, ein Lichtsignal aussendende Reaktion eines aktivierten Fluoreszenzfarbstoffes. Die Intensität dieses Lichtsignals wird gemessen und die Anzahl der durchlaufenen Zyklen bis zum Erreichen eines festgelegten Schwellenwertes (CT-Wert) aufgezeichnet. Je niedriger dieser ausgegebene CT-Wert ist, desto höher war die Anfangskonzentration der gesuchten DNA in der untersuchten Probe (ANKLAM et al., 2017).

Der LAMP-Test ist eine spezifische DNA-Nachweismethode. Gegenüber dem klassischen PCR-Verfahren zum DNA-Nachweis ermöglicht der LAMP-Test einen DNA-Nachweis der gesuchten Erreger mit nur einer Temperatursteigerungsphase. Für diese Untersuchungsmethode und deren technische Durchführung reicht oft eine gängige Laborausrüstung mit einem Wasserbad oder Heizblock. Diese Methode ist sowohl zeitsparend als auch ressourcenschonend (HARA-KUDO et al., 2007). Der LAMP-Test ist ein hoch sensitives, schnelles sowie 100% spezifisches, isothermes Nachweisverfahren (ANKLAM et al., 2017).

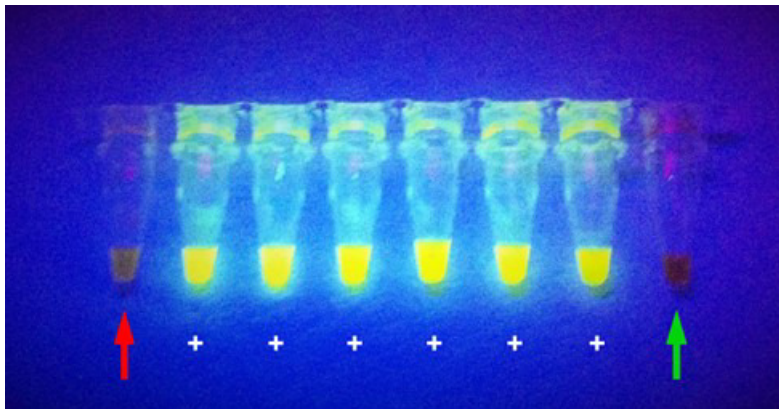


Abbildung 3: LAMP-Test Auswertung unter UV-Licht

1. Probe (roter Pfeil) Negativkontrolle mit Nuclease free water, keine Fluoreszenz, kein Cybergreen an gesuchter Ziel-DNA gebunden

+ positive Fluoreszenzreaktion nach Primerbindung an die gesuchte Treponemen-DNA

8. Probe (grüner Pfeil) Negativkontrolle mit E.coli, keine Fluoreszenz, kein Cybergreen an gesuchter Ziel-DNA gebunden

Für die Anwendung der LAMP-Methodik wird von dem zu untersuchenden Probenmaterial 1 ml dafür verwendet, einen Nachweis der Erreger-DNA zu fahren. Nach vorheriger Aufbereitung der Probe wird diese mit Primern versehen, die jeweils eine Bindungsstelle einer Subspezies der zu untersuchenden Treponemen aufweisen. Ist die gesuchte DNA in der Probe vorhanden, kommt es zu einer Bindung zwischen der zu untersuchenden DNA und dem Primer. Die Bindungsreaktionen zwischen der gesuchten DNA und den zugegebenen Primern wird durch ein Erhitzen der Probe abgebrochen. Um die mögliche, positive Bindungsreaktion sichtbar und auswertbar zu machen, wird der Probe im folgenden Untersuchungsschritt Cybergreen hinzugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wird an einen erfolgreich gebundenen Primer angelagert und zeigt im Schwarzlicht so einen positiven DNA-Nachweis an. In jeden Untersuchungsdurchgang werden zwei definierte Negativkontrollproben integriert, um den korrekten Ablauf der Untersuchung überprüfen zu können.

Für den einfachen Nachweis von Treponemen-DNA ohne die Differenzierung der Subspezies gibt es schon länger Primer für die Durchführung von PCR-Untersuchungen (KLITGAARD et al., 2008). Ein neues Verfahren sowohl in der real time PCR, als auch in der LAMP-Methodik (Loop-mediated isothermal amplification-Test), ermöglicht nun kleinere phylogenetische Untergruppen zu detektieren (ANKLAM et al., 2017) und die Differenzierung von Subspezies ist so gegeben.

Die Untersuchung von Proben mit der LAMP-Methode ermöglicht nun das Erstellen von betriebsspezifischen Profilen der Treponemen Subspezies nach Probenentnahme. Für eine mögliche betriebsspezifische Entwicklung einer Vakzine oder die Einbeziehung der Information über die in der Läsion vorherrschenden Subspezies kann in der weiteren Forschung für die Beurteilung eines positiven bzw. negativen Behandlungserfolgs einer DD-Läsion von großer Bedeutung sein.

3 Zielstellung

In der vorliegenden Studie soll ein Nachweis über die Effektivität der unterschiedlichen Behandlungsmethoden geführt werden. Der Vergleich zwischen antibiotischen und nicht antibiotischen Behandlungsmethoden bildet die Grundlage für die später vergleichende Auswertung der Ergebnisse im Hinblick auf die Wirksamkeit. Gesucht wird nach einer effektiven, schmerzreduzierenden Therapieform ohne Wartezeit auf Milch und Fleisch, welche auch für größere Tierzahlen umsetzbar ist.

Der Vergleich soll herausstellen, ob antibiotikafreie Behandlungsmethoden antibiotikahaltigen in der topischen Anwendung überlegen sind, bei Anwendung eines Medikaments eine Tiefenwirksamkeit auf die Erreger im Gewebe gegeben ist und die Anwendungsberechtigung von Antibiotika unterstrichen oder im Vergleich mit den antibiotikumfreien Präparaten entkräftet wird.

4 Tiere, Material und Methoden

4.1 Tiere und Betriebe

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Untersuchungen auf fünf Milchviehbetrieben durchgeführt. Alle fünf Betriebe, auf denen Proben für die Studie entnommen wurden, liegen in den Regierungsbezirken Oberbayern und Schwaben in Bayern, Deutschland.

4.1.1 Haltungssysteme

Alle an dem Versuch beteiligten Milchviehbetriebe haben Laufstallhaltung. Jedem Tier ist es also möglich, den Großteil des Tages selbstbestimmt den Aufenthaltsort innerhalb des Stalls aufzusuchen. Keiner der Betriebe arbeitet mit gelenktem Kuhverkehr. Auf allen fünf Betrieben wird eine auf Grassilage basierte Totale-Mischration (TMR) gefüttert.

Tabelle 4: Übersicht der Aufstallungen auf den Versuchsbetrieben

Betrieb	Anzahl Kühe im Betrieb	Liegeboxen	Melksystem	Laufgänge/ Reinigungssystem	Futternvorlage
Betrieb 1	160	Hochboxen (Gummimatte)	AMS	Spaltenboden +Roboter (selbstfahrend)	Bandfütterung
Betrieb 2	80	Hochboxen (Gummimatte)	AMS	Spaltenboden +Roboter (selbstfahrend)	Futtermischwagen
Betrieb 3	160	Tiefboxen (Stroh-Mist-Matratze)	AMS	Planbefestigt +Schieber	Futtermischwagen
Betrieb 4	70	Tiefboxen (Stroh-Mist-Matratze)	Fischgräten- Melkstand	Spaltenboden	Futtermischwagen
Betrieb 5	60	Hochboxen (Gummimatte)	Fischgräten- Melkstand	Planbefestigt +Schieber	Futtermischwagen

4.1.2 Management der Klauengesundheit

Die Klauengesundheit auf einem rinderhaltenden Betrieb ist neben den Haltungsbedingungen maßgeblich von der Qualität und dem Intervall der Klauenpflege abhängig. Im Rahmen der Studie wurde für die routinemäßige Klauenpflege der jeweiligen Herde ausschließlich mit einem hydraulischen Durchtreibbestand gearbeitet. Für die Nachsorge standen unterschiedliche Modelle auf den Betrieben zur Verfügung.

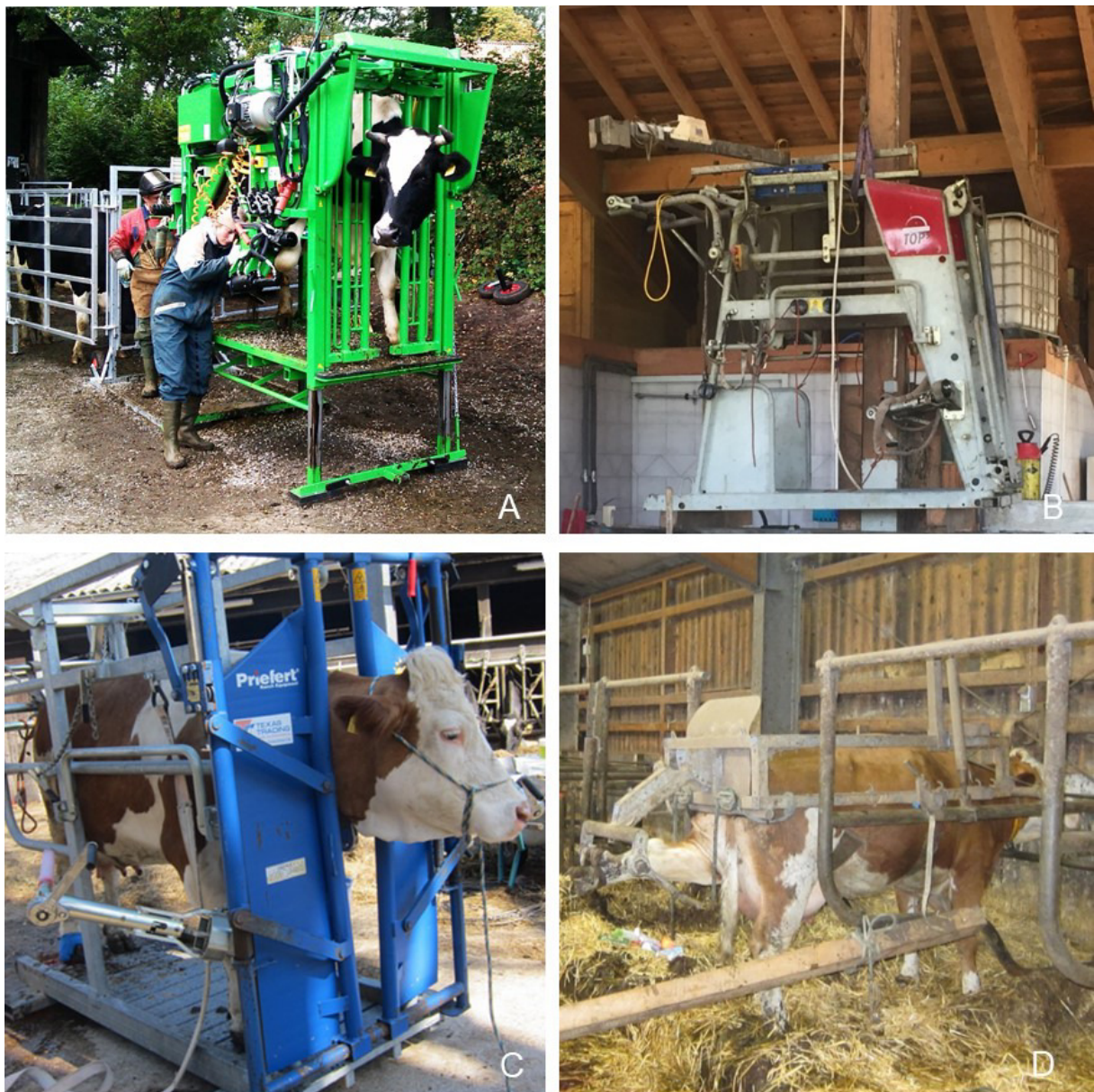


Abbildung 4: Durchtreibbestände für die Klauenpflege; A: Klauenpflegestand 800-1 (KVK), B: Top 5 (Rosensteiner), C: Priefert (Texas Trading), D: Speed-Fix (Ametsreiter)

In vier der fünf Studienbetriebe wird die laktierende Herde mindestens alle sechs Monate von einem erfahrenen und nach staatlicher Prüfungsordnung geprüften Klauenpfleger an den Klauen gepflegt. Tiere, die in der Zwischenzeit mit einem Lahmheitsscore ≥ 3 auffällig werden (SPRECHER et al., 1997), versorgen die jeweiligen Landwirte eigenverantwortlich nach dem 5-Punkte Plan der funktionellen Klauenpflege. Lediglich Betrieb 1 lässt routinemäßig alle vier Monate einen Herdenschnitt von einem staatlich geprüften Klauenpfleger durchführen.

4.1.3 Krankheitshistorie

Für die Vorbereitung der Studie wurden die dokumentierten M-Stadien je Einzeltier isoliert betrachtet. Die Historie zu vorangegangenen Erkrankungen der DD ermöglicht die Zuordnung des jeweiligen Kuh-Typs (siehe 2.2.3). Je nach Betrieb erstreckt sich der Umfang der Datenerfassung für die Krankheitshistorie auf 6-30 Monate. In der vorliegenden Studie werden dem Kuh-Typ 1 alle Kühe zugeordnet, die weder zu den vor Versuchsbeginn erhobenen Evaluationsterminen noch zum ersten Untersuchungstermin Anzeichen einer DD-Läsion an den Hintergliedmaßen aufwiesen (M0). Dem Typ 2 werden alle Kühe zugeordnet, die zu den vor Versuchsbeginn erhobenen Evaluationsterminen frei von DD-Läsionen an den Hintergliedmaßen waren und zu Beginn der Studie ihre erste M2-Läsion aufweisen. Der Kuh-Typ 3 ist identisch mit der verwendeten Definition nach Döpfer (2009) aufgenommen und repräsentiert die chronisch an DD erkrankten Tiere in dieser Studie.

Tabelle 5: Kuh Typen modifiziert nach Döpfer (DOEPFER, 2009)

Kuh-Typ	Beschreibung
Kuh-Typ 1	Ein Tier, das keine DD-Läsionen entwickelt hat und für mindestens 6 Monate seit dem Beginn der Befunddokumentation auf dem Betrieb als M0 gescorert wird.
Kuh-Typ 2	Ein Tier, das am Tag des Studienbeginns, die erste festgestellte M2-Läsion seit dem Beginn der Befunddokumentation auf dem Betrieb zeigt.
Kuh-Typ 3	Ein Tier, das wiederholte Episoden mit akuten M2-Läsionen seit dem Beginn der Befunddokumentation auf dem Betrieb zeigt. Das Zeitintervall zwischen den festgestellten Läsionen kann auch lediglich 10-14 Tage betragen.

Die Kuh-Typen 2 und 3 sind für die Studie von grundlegender Bedeutung. Erst wenn einem Tier am Tag des Studienbeginns mit entsprechenden Daten der vorangehenden Erfassungszeitpunkte über eine Historie und dem aktuellen Befund ein Kuh-Typ zugeordnet werden kann, wird dieses Tier randomisiert einer der fünf Behandlungsgruppen zugewiesen.

4.1.4 Leistungs- und Reproduktionsdaten

Jedes Tier wurde zunächst mit seiner tierindividuellen Kennzeichnung (Ohrmarkennummer) in der Studie erfasst. Die eingetragene Rasse und der Name des als Vattertier registrierten Zuchtbullen wurden, neben der letzten Abkalbung und der zu Versuchsbeginn aktuellen Laktationsnummer, zusätzlich zum vorliegenden Reproduktionsstatus aufgenommen. Die bei der Datenerfassung aufgezeichnete Milchmenge beinhaltet drei Tagesmilchmengen. Die Erfassung erfolgte jeweils kurz vor dem Studienbeginn (-5 Tage), kurz nach der Behandlungsphase (Tag 35) und 30 Tage nach Beendigung der Studie (Tag 65). Bei der Erfassung der Milchmenge als Durchschnittswert ist es entscheidend, nicht den Tag einer Stanzprobenentnahme (siehe unten) zu wählen. Ein möglicher negativer Effekt auf das Tagesgemelk durch das Treiben und Separieren der Studientiere kann sonst nicht ausgeschlossen werden. Drei Betriebe nutzen die Milchmengenerfassung durch das jeweilige AMS. Hier kann ein tagesaktueller Wert erhoben werden. Zwei Betriebe arbeiten jeweils mit einem Fischgrätenmelkstand und lassen die Milchmengenmessung inkl. der Milchprobenentnahme der Einzeltiere im Melkstand durchführen. Hier erfolgt die unangekündigte Milchmengenmessung jedes Einzeltieres einmal monatlich an zwei aufeinander folgenden Melkzeiten, um das durchschnittliche Tagesgemelk sowie die tierindividuellen Milchinhaltsstoffe des Monats zu ermitteln. Diese Daten wurden für die Erhebung der Milchmenge der Studientiere übernommen.



Abbildung 5: Fischgrätenmelkstand, Automatisches Melksystem (AMS), Melkkarussell

Neben der reinen Milchmengenmessung wurde auch der MilCHFett-, Milcheiweiß- und der Harnstoffgehalt in der Probe bestimmt. So konnte einzeltierspezifisch oder auf Herdenniveau die Eiweiß-, Struktur- und Energieversorgung der Milchkühe in ihrem jeweiligen Laktationsstadium beurteilt und ein Rückschluss auf die Güte der Rationsgestaltung vorgenommen werden.

4.1.5 Kriterien zur Aufnahme in die Studie

Für die Teilnahme eines Betriebs an der Studie war es unerlässlich, dass über den Zeitraum des laufenden Versuchs keine sekundären Behandlungen oder Präventivmaßnahmen in Form von Sprayapplikationen oder Klauenbädern an den Einzeltieren bzw. in der Herde durchgeführt wurden.

Zu Beginn der Studie wurde auf den teilnehmenden Betrieben eine routinemäßige funktionelle Klauenpflege durchgeführt.

Potentielle Studientiere:

- wiesen den Habitus einer klinisch gesunden Kuh auf,
- verfügten über eine Krankheitsgeschichte der Klauenbefunde (im Rahmen der Voruntersuchungen erfasst), die zur Kuh-Typisierung führte,
- waren frei von den Hornschuh perforierenden Defekten wie z.B. Rusterholzsches Sohlengeschwür und
- hatten innerhalb der letzten 14 Tage vor Studienbeginn keine systemische Antibiose erhalten.

Wies das jeweilige Tier am Tag der Untersuchung eine M2-Läsion ($\geq 2\text{cm}$) auf, wurde es in die Studie aufgenommen. Im Anschluss an die Eingangsuntersuchung des Tieres erfolgte die Integration in die Studie über das Score Sheet 1 (siehe 4.2.1).

Nach der randomisierten Zuordnung der Einzeltiere zu einer der fünf Behandlungsgruppen wurde eine neutrale Probennummer zugeordnet. Führt eine Sekundärerkrankung oder eine zusätzliche antibiotische Behandlung zum Ausschluss eines Tieres aus der Studie, wurde der Grund mit dem Ausschlussdatum notiert. Mögliche Abgangsursachen sowie das jeweilige Abgangsdatum wurden ebenfalls aufgenommen.

4.2 Versuchsaufbau

Die Versuchsphase auf den landwirtschaftlichen Betrieben mit anschließender Nachsorge erstreckte sich von der ersten Probenentnahme am 24. August 2016 bis zur letzten Verbandsabnahme der Gruppen A und E am 01. Juni 2017. In dieser Zeitspanne wurden acht Studiendurchläufe nach dem im Folgenden beschriebenen Versuchsprotokoll (Dauer: 45 Tage) auf fünf bayrischen Milchviehbetrieben durchgeführt.

Während eines Versuchszyklusses wurden folgende Arbeitskomplexe pro Tier durchgeführt.

1. Evaluierung des Allgemeinzustandes des Tieres
2. Makroskopische Läsionsbeurteilung
3. Mikroskopische Läsionsbeurteilung
4. Fotografische Dokumentation
5. Behandlung der Läsion

4.2.1 Evaluierung des Allgemeinzustandes des Tieres

Für die Evaluierung des Allgemeinzustandes des Einzeltieres in der Studie wurden drei unterschiedliche Score Sheets verwendet.

- Score Sheet 1: Ausschlusskriterien aus dem Versuch bei der Eingangsuntersuchung
- Score Sheet 2: Aufzeichnungsplan
- Score Sheet 3: Ausschlusskriterien aus dem Versuch während der Versuchsphase

Die Ergebnisse der Kontrollen wurden in das jeweilige Score Sheet 1-3 (siehe Anhang) des einzelnen Tieres eingetragen.

Das **Score Sheet 1** diente der Beurteilung des Gesundheitszustandes eines Tieres zur Aufnahme in die Studie. Es umfasste vier zu beurteilende Merkmale mit jeweils sechs möglichen Score-Punkten. Diese Beurteilungskriterien schlossen

- das Verhalten des Tieres (0-5 Punkte),
- die Ergebnisse der gerade erfolgten Klauenpflege (0-5 Punkte),
- das gezeigte Gangbild ohne Druck eines Treibers (0-5 Punkte) sowie
- die Atmung in Ruhe (0-5 Punkte) ein.

Alle Scores ≥ 2 führten zu einer Nichtaufnahme in die Studie.

Score Sheet 2 umfasste zwei Kontrollkomplexe für die tägliche Tierbeobachtung über den gesamten Versuchszyklus auf dem jeweiligen Betrieb. Im ersten Abschnitt folgten nach der Beurteilung des Gangbildes entsprechend des LS nach Sprecher (SPRECHER et al., 1997) explizite Kontrollen der behandelten Gliedmaße. Für einen reibungslosen Versuchsablauf durften weder Schwellungen, Rötungen noch ein Entlasten der betroffenen Gliedmaße detektiert werden. Andernfalls folgte die Hinzuziehung des Score Sheet 3 zur Dokumentation der Ausschlusskriterien. Der Verlust eines Verbandes wurde dokumentiert und der Verband umgehend am selben Tag erneuert.

Der zweite Abschnitt des Score Sheet 2 umfasste eine sichtbare Phlegmone sowie systemische Anzeichen eines sekundären Krankheitsgeschehens, Fieber oder grundsätzlich ein Verabreichen einer systemischen Antibiose aufgrund weiterer Erkrankungen. Ein positiver Vermerk bei einem der vier zuvor genannten Punkte führte zum Ausschluss des Tieres aus der laufenden Studie.

Im Gegensatz zu Score Sheet 1 und 2, welche für jedes Tier in der Studie zwingend ausgefüllt werden mussten, wurde **Score Sheet 3** nur im Falle eines positiven Vermerks auf Score Sheet 2 hinzugezogen. Das dritte Score Sheet diente der Evaluation eines möglichen Ausschlusses eines Tieres aus der laufenden Studie. Der Aufbau war dem Score Sheet 1 entlehnt. Es werden fünf Beurteilungskriterien mit jeweils sechs möglichen Score-Punkten evaluiert. Beurteilt wird:

- das gezeigte Gangbild im freien Gehen ohne Treiben,
- mögliche Schwellung oder Rötung der distalen Gliedmaße,
- die Atmung in Ruhe,
- eine systemische Antibiose sowie
- die Rektaltemperatur in °C bei verschlechtertem Allgemeinbefinden.

Alle Scores ≥ 1 führen zu einem Ausschluss aus der Studie.

4.2.2 Makroskopische Läsionsbeurteilung

4.2.2.1.1 M-Score

Für eine gute Beurteilungsmöglichkeit von Läsionen an der Klaue und die Dokumentation der Befunde ist die Schaffung eines adäquaten Arbeitsplatzes mit einem Klauenpflegestand sowie Klauenmesser, fließend Wasser und ausreichend Licht unabdingbar. Die Anwendung entsprechender Daten könnte insbesondere im Rahmen einer Zuchtwertschätzung genutzt werden.

Die Läsionen der DD wurden im Klauenstand vor der Bonitierung trocken mit einem Einmal-Papiertuch gereinigt. So wurde verhindert, dass kleine Läsionen unter einer Schmutzkruste übersehen wurden. Die Reinigung ermöglichte eine adäquate Sicht auf den Umfang der Erkrankung, half Fehleinschätzungen der Krankheitssituation zu vermeiden (DOEPFER, 2009) und bereitete eine anschließende Therapie grundsätzlich vor. Zusätzlich wurde der Zwischenklauenspalt mit einer Sprengringzange gespreizt, um auch diesen Bereich objektiv beurteilen zu können (WILSON-WELDER et al., 2015b). Die Läsionen der DD wurden in der gesamten Studie ausschließlich nach Döpfer (DOPFER et al., 1997) entsprechend einem festgelegten Bewertungsschema in unterschiedliche Erkrankungsstadien (M-Scores) eingeteilt und befundet. Diese differenzierte Betrachtung war möglich, da alle Untersuchungen im Klauenstand durchgeführt wurden und die Differenzierung der Stadien somit möglich war (CRAMER et al., 2018). Die erhobenen Befunde wurden in ein digitales Erfassungsprogramm für Klauenbefunde (DD Check App) eingeführt.

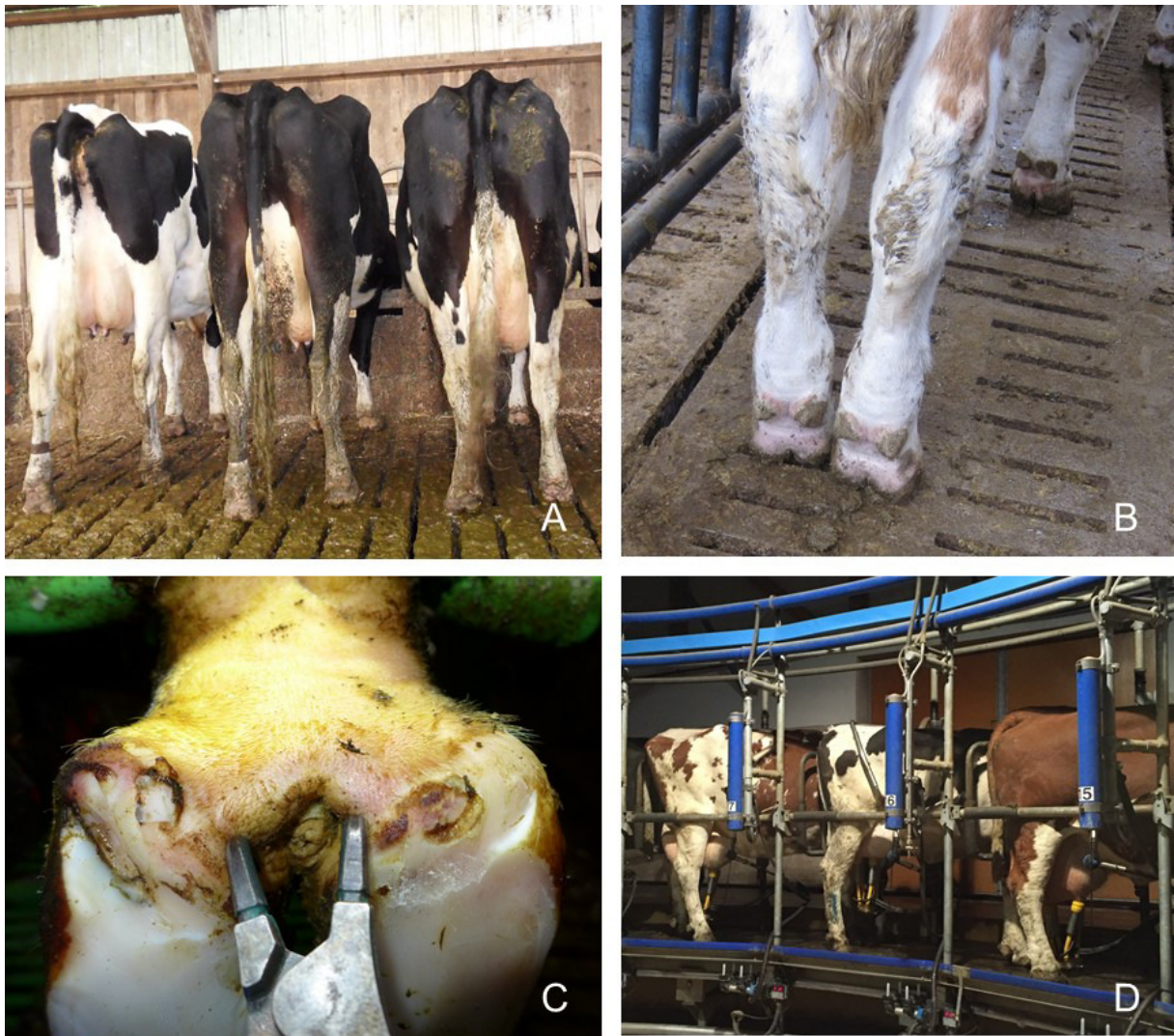


Abbildung 6: A: Penwalk, Kühe im Fressgitter fixiert, B: Läsionsbeurteilung in einer Kleingruppe von Tieren, C: Läsionsbeurteilung inkl. ZKS mit Sprengringzange im Klauenstand, D: Läsionsbeurteilung während des Melkens

4.2.2.1.2 Pain-Score

Zusätzlich zur beschriebenen oberflächlichen, rein klinischen Beurteilung der M-Stadien wurde die Dokumentation um die Schmerzhaftigkeit der vorliegenden DD-Läsionen ergänzt. Hierbei wurde ein digitaler Druckschmerz detektiert: Beurteilt wurde die Abwehrreaktion auf die Ausübung eines festen Fingerdrucks auf die vorliegende Läsion. Reagierte das im Klauenstand am untersuchten Fuß fixierte Tier nach Erstkontakt wiederholt mit deutlichen Muskelkontraktionen im M. semimembranosus und M. semitendinosus, wurde diese Abwehrreaktion als positive

Schmerzreaktion gewertet (RIEGLER, 2014). Im negativen Fall konnte keine Muskelkontraktion beobachtet werden.

4.2.2.2 Befundung und Dokumentation auf dem Betrieb

Auf den Milchviehbetrieben wurden die Daten zur Klauengesundheit im Rahmen der routinemäßigen Klauenpflege erfasst. Die Dokumentation umfasste hierbei

- die Ohrmarke,
- die tierindividuell zugeordnete Stallnummer (Halsband, Transpondernummer),
- die jeweils untersuchte Gliedmaße,
- die Klauenerkrankung bzw. der Befund mit der jeweiligen Ausprägung sowie
- die durchgeführte Behandlung.

Die Befunderhebung und anschließende Dokumentation erfolgte anhand einer Modifikation des Diagnoseschlüssels der Zehenerkrankungen, des DLG-Ausschusses für Klauengesundheit (Tabelle 6). Befunde wurden in ein Erfassungsprogramm für Klauenbefunde (RP_KlauenBonitur) eingegeben.

Tabelle 6: Diagnoseschlüssel Klauenerkrankungen (modifiziert nach DLG-Ausschuss „Klauengesundheit und Klauenhygiene“)

Abkürzung	Erkrankung	Ausprägungsgrad		
		1	2	3
RE	Klauenrehe (Laminitis)	Krümmung (Konkavität) der Dorsalwand und/oder Verfärbung der Sohlenfläche bis zu 1/3	Krümmung (Konkavität) der Dorsalwand und/oder Verfärbung der Sohlenfläche bis zu 2/3	Krümmung (Konkavität) der Dorsalwand und/oder Verfärbung der Sohlenfläche bis zu 3/3
WLD	Weiß-Linie-Defekte	Zusammenhangstrennungen: dunkel gefärbte Risse und/oder Einblutungen, oberflächlich	Zusammenhangstrennung mit entzündlichem Defekt bis 2,5 cm Durchmesser, beginnende Kanalbildung zum Kronsaum	Zusammenhangstrennung mit entzündlichem Defekt größer als 2,5 cm Durchmesser, vermutlich tiefere Strukturen betroffen
DS	Doppelte Sohle	Ausdehnung: bis 1/3 der Sohlenfläche oder größer, wenn kein entzündlicher Defekt	Ausdehnung: bis 2/3 der Sohlenfläche	Ausdehnung: bis 3/3 der Sohlenfläche
DID	Klauenfäule (Dermatitis interdigitalis)	Beläge ohne Veränderung der Zwischenklauenhaut	Beschädigung der Zwischenklauenhaut, Ausdehnung bis 2 cm Länge	Beschädigung der Zwischenklauenhaut, Ausdehnung über 2 cm Länge
PH	Phlegmone	Schwellung der Unterhaut	zusätzlich Beschädigung der Haut	zusätzlich nekrotische Veränderungen
RSG	Rusterholzsches Sohlengeschwür	Druckstelle oder Geschwür an typischer Lokalisation bis 1 cm Durchmesser	Geschwür an typischer Lokalisation ab 1 cm bis 2,5 cm Durchmesser, teilweise nekrotische Veränderungen	Geschwür über 2,5 cm Durchmesser, teilweise nekrotische Veränderungen
SSG	Sohlenspitzen-geschwür	siehe RSG	siehe RSG	siehe RSG
LI	Limax	ohne Spreizung	mit Spreizung	entzündet mit/ohne Spreizung
HS	Hornspalt	nicht durchlaufend von Kronsaum bis Sohle, nicht durchdringend bis Lederhaut = oberflächlich	durchlaufend, nicht durchdringend = oberflächlich	durchdringend bis zur Lederhaut = tief
B/S	Besonderheiten/sonstiges	-		
DD	Mortellarosche Krankheit (Dermatitis digitalis)	Bonitiert nach dem Bewertungsschema für Dermatitis digitalis von Dörte Döpfer		

4.2.2.2.1 RP_KlauenBonitur

Alle erhobenen Befunde wurden in ein eigens erstelltes Klauenboniturprogramm eingepflegt. Die Eingabe erfolgte über einen Laptop oder ein Tablet vor Ort durch eine Hilfsperson. Hierbei wurden alle Befunde je Gliedmaße einzeln im Programm erfasst. Verbände, das Kleben eines Klotzes, eine Überweisung an den Tierarzt oder eine notwendige Wiedervorstellung konnte direkt pro Tier abgespeichert werden. Nachsorgelisten der Einzeltiere im Klauenstand konnten direkt im Anschluss an die Klauenpflege erstellt werden.

4.2.2.2.2 DD Check App

Für die Aufnahme aller Klauendaten für die Erfassung der Einzeltierhistorien auf den Betrieben wurde das Klauenboniturprogramm RP_KlauenBonitur genutzt.

Die DD Check App wurde zeitgleich entwickelt und stand 2016 kurz vor dem Beginn der praktischen Versuchsphase auf den Betrieben zur Verfügung. Aufgrund der schnellen Möglichkeit alle relevanten Tierdaten sowie Läsionsmerkmale vor Ort zu erfassen und nach Abschluss der klinischen Studie statistisch fundiert auswerten zu können, wurde die DD Check App als zusätzliche Methode in die Studiumsetzung mit aufgenommen.

Jedes Tier wurde im Anschluss an die jeweilige Biopsieentnahme erfasst, die Läsion bewertet und direkt ihrer Behandlungsgruppe für die spätere statistische Auswertung hinzugefügt. Alle untersuchten Kühe wurden zu einer Studienherde in einem Datensatz zusammengefasst. Die Herde wurde über die Möglichkeit mehrere Pens als Untergruppierung einzufügen wie folgt abgespeichert:

- Pen 1 = Gruppe A
- Pen 2 = Gruppe B
- Pen 3 = Gruppe C
- Pen 4 = Gruppe D
- Pen 5 = Gruppe E

Sowohl die Arbeit auf dem Betrieb als auch die statistische Auswertung wurde durch die DD Check App deutlich erleichtert.

4.2.3 Mikroskopie

4.2.3.1 Biopsieentnahme

Für die Beurteilung der Treponemen in den tieferen Gewebeschichten wurden Biopsien aus dem veränderten Gewebe entnommen. Nur so konnte ein histologischer Nachweis über das Vorhandensein oder die Abwesenheit der Treponemen im Verlauf der Behandlung erbracht werden. Die Stanzproben wurden jeweils an Tag 0, 12 und 28 entnommen, wobei am Tag 0 die Probenentnahme vor Beginn jeglicher Therapiemaßnahmen erfolgte.

Nach einer gründlichen Reinigung von Klaue und Fesselbeuge mit fließendem Wasser und Seife sowie anschließender Desinfektion (Sterilium, BODE Chemie GmbH) wurde die Läsion lokal anästhesiert. Hierfür wurde die Region lokal mit 6 ml Procamidol 20mg/ml (WDT, Garbsen, Deutschland) unterspritzt und mindestens 2 Minuten bis zum Wirkungseintritt gewartet. Zusätzlich zu der Lokalanästhesie wurde jedes Tier entsprechend seines Gewichts je Biopsieentnahme einmalig mit dem Schmerzmittel Ketoprofen 100mg/ml (cp-Pharma, Burgdorf, Deutschland) behandelt. Das Schmerzmittel wurde in der Wartezeit bis zum Wirkeintritt des Lokalanästhetikums i.m. verabreicht.

Für das sichere Auffinden der Läsionsfläche, auch nach ggf. erfolgreicher Behandlungsphase wurde jede M2-Läsion in ihrem äußeren Umfang in eine Klauenskizze eingetragen (s. Abbildung 7). In dieses versuchstiereigene Dokument wurde die jeweilige Biopsieentnahmestelle eingetragen, um mögliche Doppelentnahmen oder Fehlentnahmen außerhalb des ursprünglichen Läsionsbereichs zu verhindern.

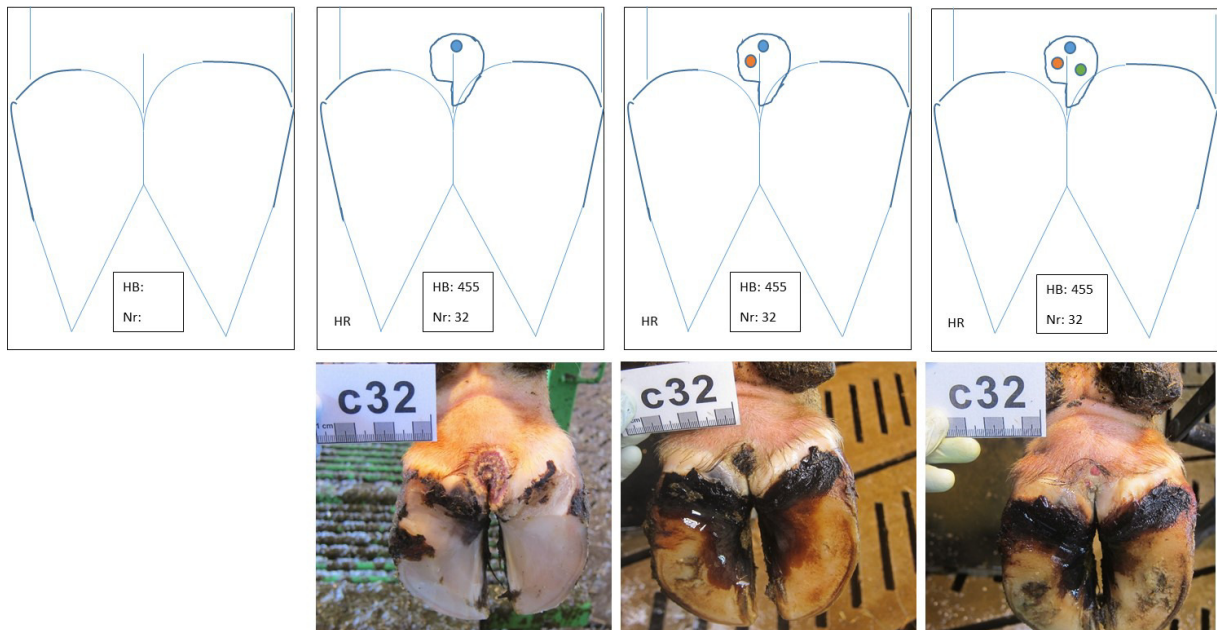


Abbildung 7: Beispiel für die Dokumentation der in die Studie integrierten M2-Läsion an der rechten Hintergliedmaße der Kuh 455(Transpondernummer) mit der zugeordneten, fortlaufenden Nummer 32 und die Entnahmestellen der Stanzbiopsien Tag 0 (blau), Tag 12 (rot) und Tag 28 (grün).

Nach Überprüfung des Anästhesieerfolgs mit Hilfe einer Kanüle wurde mit einer Biopsiestanze (steril) eine Gewebeprobe mit einem Durchmesser von 6 mm vorgestanzt. Das Bioptat wurde mit einer anatomischen Pinzette ergriffen, ggr. vorgelagert und mit einem Skalpell an der Basis abgesetzt. Nach kurzer Reinigung von möglichen Blutanhaftungen unter fließendem Wasser, wurde die Biopsie in ein vorbereitetes, bereits beschriftetes Transportbehältnis (Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml) mit 1 ml OTEB überführt. Anschließend wurde das Röhrchen für den Transport in das Labor aufrecht in einer auf 4 °C gekühlten Styroporbox verpackt.

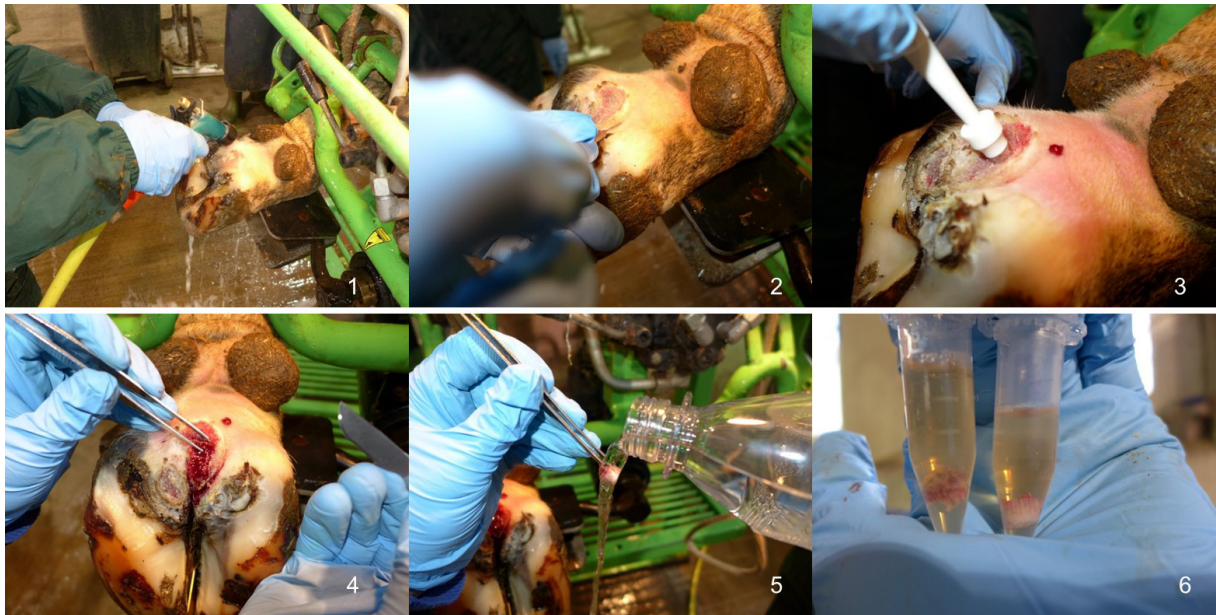


Abbildung 8: Reinigung der Zehen (1), Lokalanästhesie um die zu beprobende Läsion (2) und Biopsieentnahme aus einer M2-Läsion an einer linken Hintergliedmaße (3+4), Reinigung des Biopats (5) und Transport in 1 ml OTEB.

4.2.3.2 Probenbearbeitung im Labor

4.2.3.3 Aufarbeitung der Proben

Im Labor wurde die Biopsie mit einer sterilen Skalpellklinge auf einem frischen Objektträger längs geteilt. Hierüber erhielt man die Biopathälften I und II.

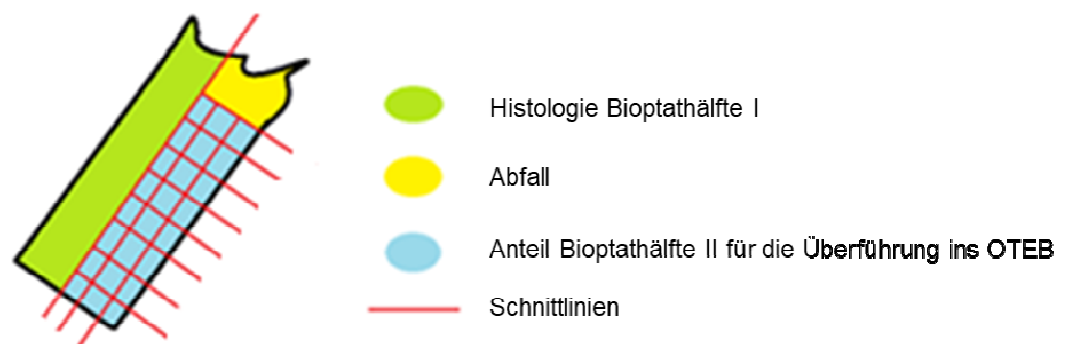


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ersten Aufbereitungsschritte des entnommenen Biopats.

Zusätzlich zu einer neuen Skalpellklinge und einer neuen Glasunterlage für jede einzelne Probe wurde die für die Fixation benötigte Pinzette jeweils für drei Minuten in 70%igem vergällten Ethanol zwischendesinfiziert. Hierüber sollte die Gefahr einer

möglichen Kreuzkontamination der nacheinander bearbeiteten Bioptate verhindert werden. An Bioptathälfte I wurde die Wundoberfläche mit der Skalpellklinge abgetrennt. Der nun vorliegende Halbzylinder wurde mit einer frischen Klinge in 1x1mm große Würfel zerkleinert und in 1 ml frisches OTEB in ein Eppendorf Tube überführt und über 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Probenhälfte wurde dann für die Dunkelfeldmikroskopie und den angeschlossenen DNA-Nachweis weiterverarbeitet. Die zweiten Halbzylinder II wurden jeweils in einer vorbeschrifteten Rotilabo®-Einbettkassette (Carl Roth®, Karlsruhe) in einem verschlossenen Gefäß in Formalin 4% (Roti-Histofix 4%, Carl Roth®, Karlsruhe) für mindestens 48 Stunden vorfixiert.

4.2.3.3.1 Fixieren, Einbetten und Schneiden der Bioptathälfte II

Im Anschluss an die **Fixierung** der Bioptathälfte II in Formalin 4% (Roti-Histofix 4%, Carl Roth®, Karlsruhe) für mindestens 48 Stunden, werden die Proben für mindestens 12 Stunden in fließendem Leitungswasser gewässert. Die weitere Vorbereitung der Proben für das spätere Ausgießen in Paraffin erfolgt per Hand über eine aufsteigende Alkoholreihe nach folgendem Schema:

1. 2-maliges Überführen der Proben in frischen, vergällten Ethanol (70%) für jeweils 24 Stunden
2. 2-maliges Überführen der Proben in frischen, vergällten Ethanol (96%) für jeweils 24 Stunden
3. 2-maliges Überführen der Proben in frisches Isopropanol für jeweils 24 Stunden
4. 2-maliges Überführen der Proben in frisches Xylol für jeweils 24 Stunden

Beim Durchlaufen der Punkte 1-4 befinden sich die Probengefäße für ein gleichmäßiges Schwenken auf einem Rüttler (Heidolph, Polymax 1040 T®, Schwabach). Im Anschluss folgt die Überführung der Proben per Hand in einem erneuten 24-Stunden-Rhythmus vom Typ 1 Paraffin über Typ 3 und Typ 6 in das Typ 9-Paraffin (alle Paraffintypen je von Thermo Fisher®, Waltham, U.S.A.). Während dieser vier Tage verbleiben die Probengefäße bei konstanten 62°C im Wärmeschränk (Memmert U 30®, Schwabach) um das Paraffin flüssig zu erhalten.

Zum **Einbetten** der Proben werden diese an Tag fünf nach der aufsteigenden Alkoholreihe an der Ausgießstation (Medite TES 99®, Burgdorf) in Eingießrahmen mit Typ 9 -Paraffin ausgegossen und auf die unter Punkt 4.2.3.2 beschriftete Rotilabo®-Einbettkassetten (Carl Roth®, Karlsruhe) fixiert.

Die histologischen **Schnitte**, der in Paraffin eingebetteten Proben, entstehen an einem Rotationsmikrotom (Microm HM 360®, Walldorf), unter Verwendung von N35 Mikrotomklingen (Feather®, Osaka, Japan), bei einer Schnittdicke von 4 µm. Nach der Schaffung einer korrekten Anschnittfläche werden jeweils zwei bis vier Mikrotomschnitte sowohl auf sieben Superfrost plus Objektträger (Carl Roth®, Karlsruhe) als auch auf sieben Standard Objektträger (Carl Roth®, Karlsruhe) verbracht. Alle Objektträger sind zuvor beschriftet und mit einigen Tropfen destilliertem Wasser versehen worden. Die frischen Mikrotomschnitte werden auf diese Wasserblase gelegt und vorsichtig auf einer Wärmeplatte (Medite OTS 40®, Burgdorf) gestreckt. Anschließend lagern die Schnitte für mindestens 72 Stunden zum Trocknen im Wärmeschränk bei 38°C (Memmert U 30®, Schwabach), bevor sie gefärbt oder in Objektträgerkästen (Carl Roth®, Karlsruhe) verpackt werden können.

4.2.3.4 Färbungen

4.2.3.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine der weitest verbreiteten Routinefärbemethoden zur Untersuchung von morphologischen Unterschieden von Gewebestrukturen (LANG, 2013). In der Studie wird diese Methode als Übersichtsfärbung herangezogen und ermöglicht später die differenzierte Betrachtung der einzelnen Hautschichten und deren Integrität.

Das folgende Färbeprotokoll wird standardmäßig am Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU München in einer Färbereihe angewendet:

- Die getrockneten Schnitte auf den Objektträgern kommen zweimal für jeweils fünf Minuten in Glasschiffchen zu je 19 Objektträgern zum Entparaffinieren in Xylol.
- 2-maliges Baden in Isopropanol für jeweils zwei Minuten,
- 1-maliges Einsetzen in Ethanol (96 %) für zwei Minuten,
- 1-maliges Überführen in Ethanol (70 %) für zwei Minuten.

Nach dem Überführen der Probenschnitte vom Paraffin in die wässrige Phase und einem dreiminütigen Waschen in destilliertem Wasser, erfolgt das Färben der Schnitte.

- Anschließend kommen die Objektträger für 10 Minuten in filtriertes Hämalun (Merck®, Darmstadt).
- Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser erfolgt über 10 Minuten das Bläuen der Schnitte in fließendem Leitungswasser.
- Die nun folgende Färbung mit Eosin (Merck®, Darmstadt) bedarf einer Einwirkzeit von drei Minuten und es schließt sich erneut ein kurzzeitiges Waschen in destilliertem Wasser an.

Nach der Färbung werden die Schnitte in zwei Schritten über Ethanol 70 % und anschließend Ethanol 96 % differenziert. Das Fixieren der Färbung in den Schnitten wird nach der aufsteigenden Alkoholreihe durch zweimaliges Baden in Isopropanol für je fünf Minuten erreicht. Anschließend werden die Schnitte noch in Xylol geklärt. Im Abzug werden die Schnitte mit Eukitt (Fluka®, Sigma-Aldrich®, St. Louis, U. S. A.c) unter Deckgläsern dauerhaft eingedeckelt und anschließend zum Ausdampfen und erneutem Trocknen unter dem Abzug belassen.

4.2.3.4.2 Versilberung nach Warthin und Starry

Die Technik der Silberfärbung nach Warthin-Starry ist eine histologische Nachweismethode, um Spirochäten anzufärben (LANG, 2013; RADOLF, 1996). Mit dieser Methodik können die Erregermenge sowie spiralisierte und enzystierte Formen der vorliegenden Treponemen bewertet und die Eindringtiefe der Erreger ins Gewebe beurteilt werden (KLITGAARD et al., 2008). Diese Art der Silberfärbung ist für den vorliegenden Vergleich von elementarer Bedeutung. Diese Nachweismethode und die dazugehörige Verfahrensanweisung zur Durchführung werden von Morphisto GmbH, Frankfurt, Deutschland zur Verfügung gestellt. Neue Möglichkeiten im hauseigenen Labor des Lehrstuhls der Anatomie, Histologie und Embryologie der LMU München, ermöglichten sowohl die Verarbeitung als auch die Auswertung zu großen Teilen im eigenen Haus durchzuführen. Lediglich die Versilberung der histologischen Präparate, die Digitalisierung und eine zusätzliche, geblindete Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Laborbetrieb Morphisto GmbH in Frankfurt erarbeitet. Diese Möglichkeit stellte eine deutliche Zeit- sowie

Kostenersparnis gegenüber der ursprünglichen Planung dar. Alle Arbeiten konnten so an zwei nahegelegenen Standorten in einem Land gebündelt werden.

4.2.3.5 Mikroskopie

4.2.3.5.1 Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie

Die beweglichen Treponemen können bei einer 40-fachen Vergrößerung sehr gut dargestellt werden. Durch die bewegliche, spiralisierte Form kann man einen positiven Lebendnachweis klar definieren. Alle in der Dunkelfeldmikroskopie nachgewiesenen Treponemen müssen aktiv aus der Probe ausgewandert sein, da die zerkleinerte Biopsie (Biopthälfte I) im Labor in frisches Medium verbracht und über 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Für eine erste Orientierung zu der jeweils vorliegenden Probe wurde die Phasenkontrastmikroskopie in der 40-fachen Vergrößerung genutzt. Nach einer Orientierungsphase folgte die Beurteilung der Kontamination mit Kokken und Stäbchen. Für die eigentliche Erfassung der Anzahl der Treponemen wurde ein Tropfen (0,01ml Probenmaterial) mit einer Eppendorfpipette auf einen Objektträger (76x26mm, Roth, Karlsruhe) aufgetropft und mit einem Deckgläschen (24x40mm) gedeckelt. Die Probe wurde anschließend für eine Dauer von 3 Minuten (Stoppuhr) im Dunkelfeld durchgerastert. Im reinen Probenvergleich kann so eine Aussage über die Konzentration der Treponemen (Anzahl Treponemen/10µl) in der Probe gemacht werden. Falls in dieser Zeitspanne keine Treponemen gezählt wurden, wurde zusätzlich verfahrensgleich das Transportmedium der Biopsie ebenfalls unter dem Mikroskop betrachtet. Einer Bewertung mit der Aussage Null Treponemen geht somit eine erweiterte Beurteilung voraus. Im Anschluss an die Dunkelfeldmikroskopie folgte für einen erweiterten Überblick ein Durchrastern der vorliegenden Probe mit der Technik der Phasenkontrastmikroskopie in der 40-fachen Vergrößerung.

Die Kontamination erstreckte sich von 0(-) „keine“, über 1((+)) „sehr vereinzelt“ Treponemen sichtbar, nach 2(+) „deutlich“, zu 3(++), „massive Besiedelung“ mit Treponemen. Wichtig ist auch die Bewertung der Aktivität und Beweglichkeit der einzelnen Treponemen in der Probe. Die Beurteilung beinhaltet ebenfalls 0(-) „keine Kontraktionen“, über 1((+)) „sehr vereinzelt Kontraktionen“, nach 2(+) „deutliche Kontraktionen“, sowie 3(++), „quirliches Drehen um die eigene Achse“.

4.2.3.5.2 Auswertung der histologischen Präparate

Der histologische Teil der Arbeit basiert auf der Auswertung der beiden zuvor beschriebenen Färbemethoden Hämatoxylin-Eosin-Färbung (Objektträger (OT) 11) und der Warthin–Starry-Versilberung (OT 14). Ausgewertet wurde jeweils der am gleichmäßigsten eingefärbte sowie repräsentativste und vollständigste Schnitt auf dem vorliegenden Objektträger.

Die Beurteilung der histologischen Präparate der Bioptate der Tage 0,12 sowie 28 in der **HE-Färbung** fokussiert sich auf drei aufeinander aufbauende Gewebeebenen. Auf die Beurteilung des *Stratum corneum* (Barrier I) folgt die Betrachtung des *Stratum granulosum* sowie des *Stratum spinosum* gemeinsam als Barrier II. Die Basalmembran repräsentiert abschließend die Barrier III. Alle drei Barrieren werden nach den gleichen Kriterien auf ihre Kontinuität überprüft.

Tabelle 7: Aufbau der histologischen Beurteilungskriterien der HE-Schnitte

Bewertungseinheit	Bewertungskriterium	Ergebnis
Barrier I (<i>Stratum corneum</i>)	vorhanden	ja/nein
	kontinuierlich intakt	ja/nein
	eben	ja/nein
	Dicke physiologisch (25-30µm)	ja/nein/plus
	orthokeratotisch	ja/nein
Barrier II (<i>Stratum granulosum</i> + <i>Stratum spinosum</i>)	intakt	ja/nein
	Dicke physiologisch (100-150µm)	ja/nein/plus
Barrier III (<i>Stratum basale</i>)	vorhanden	ja/nein
	kontinuierlich intakt	ja/nein
Anzeichen einer Chronizität	Entzündung	akut/chronisch
	perivaskuläre Infiltration	normal/plus
	Proliferation (Mitoserate)	normal/plus

Zu diesen strukturellen Beurteilungskriterien folgt die Klärung der Chronizität des vorliegenden Geschehens nach pathologischen Gesichtspunkten. Vorhandene Plasmazellen sowie ausgereifte Blutgefäße zeigen ein chronisches Geschehen an. Ein akutes Krankheitsgeschehen wird über ein Ödem unter dem *Stratum basale*, juvenile Gefäße sowie eine deutliche Füllung dieser mit Erythrozyten beurteilt. Die perivaskuläre Infiltration (normal/plus) und die Proliferation (normal/plus) in dem Gewebeschnitt wird abschließend befundet.

Das Vorliegen der Treponemen in den unterschiedlichen Gewebeschichten über den Verlauf der Biopsieentnahmen wird anhand der **Warthin-Starry-Versilberungen** ausgewertet. Das Bewertungsschema lässt lediglich eine positive (ja) oder negative (nein) Aussage über die Anwesenheit der Erreger zu und orientiert sich ebenfalls an dem zuvor beschriebenen Barrier-Model. Auf die Beurteilung der Barrier I folgen zwei Bewertungskriterien zu Barrier II. *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* werden als Einheit zusammengefasst. Das folgende Kriterium erfasst das Vordringen der Treponemen bis zum *Stratum basale*. Abschließend folgt die Unterteilung in die oberflächlichere (papilläre) sowie tiefere (retikuläre) Schicht der *Dermis*. Zusätzlich wird bei den fünf Bewertungskennzeichen zwischen enzystierten und spiralisierten Formen der vorliegenden Treponemen unterschieden.

Die Erarbeitung des vorliegenden Auswertungsschemas der histologischen Präparate fand in Zusammenarbeit mit Dr. M. Majzoub-Altweck des Instituts für Tierpathologie der LMU-München und Prof. C. Mülling des Veterinär-Anatomischen Instituts der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig statt.

Zur Etablierung des erarbeiteten Evaluierungsmodells für histologische Proben aus einer DD-Läsion eines Rindes wurde im Rahmen der pathologischen Untersuchung eines Rindes Probenmaterial von gesunder und veränderter Haut (DD-Läsion) entnommen und wie zuvor beschrieben für die histologische Auswertung präpariert. Die nun vorliegenden histologischen Proben gesunder, physiologischer Haut dienen der Validierung der Auswertung des Heilungsverlaufs der Studienproben.

4.2.3.5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Probenaufbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie läuft nach einem laboreigenen Protokoll ab. Sowohl freie Treponemen im flüssigen OTEB-Medium aus der Dunkelfeldmikroskopie als auch eine abgetrennte Gewebeprobe des Wundbereichs einer Biopthälfte II wird jeweils:

- in 1% igem Sörensen-Phosphatpuffer fixiert.
- Bodensatz des OTEB-Mediums auf einen Superfrost plus OT zentrifugiert
- Zusatz von Osmium als Imprägnation zur Erhaltung der natürlichen Fettschicht der Treponemen
- Kritische-Punkt-Trocknung beider Probentypen
- Bepattern beider Proben mit Goldpalladium (17 nm dick)

4.2.4 Fotodokumentation

Alle Bilder für die Studie wurden mit einer Kamera (Canon S 90, Firma Canon, Tokio, Japan) aufgenommen.



Abbildung 10: Fotografische Zuordnung einer fortlaufenden Nummer (c2) zur individuellen Kuhidentifikation (Ohrmarke) und Transpondernummer mit der zugehörigen M2-Läsion im Versuchsverlauf an Tag 0, 12, 28

Für eine lückenlose und zeitlich unabhängige Beurteilungsmöglichkeit wird jede Kuh anfänglich mit ihrer stallspezifischen Halsbandnummer, der Ohrmarkennummer sowie der zugeordneten Nummer im Rahmen der Versuchsdurchführung fotografiert. Anschließend wird die nun zugeordnete fortlaufende Nummer mit dem jeweiligen Fuß und den bonitierten Läsionen abgelichtet. Jedes Einzelbild ist durch die Sequenz der Aufnahmen eindeutig einem Versuchstier zuzuordnen. Auf dem beschriebenen Nummernkärtchen ist eine Zentimeterskala aufgedruckt. Diese ermöglicht unabhängig von dem Betriebsbesuch die Auswertung der vorliegenden Läsionsgrößen. Im Verlauf kann so auch eine Reduktion des Läsionsdurchmessers nachvollzogen werden. Hinzu kommt nach Abschluss der Versuchsphase die

Möglichkeit, den positiven oder negativen Heilungsverlauf durch die Aneinanderreihung der Bilder objektiv darstellen und beurteilen zu können.

4.2.5 Behandlung

Die fünf in der Studie zu untersuchenden, oberflächlichen Behandlungsmethoden können in antibiotische und nicht antibiotische Anwendungen unterteilt werden.

Tabelle 8: Übersicht über die Behandlungsgruppen

Produktname	Wirkstoffe	Firma	Antibiotisch/nicht antibiotisch	Gruppe (Pen)	Tierzahl pro Gruppe (n=21)	
					Typ 2	Typ 3
Mortella Heal	Polyurethan-Wundauflage	Dr. Kenndoff GmbH & Co. KG Hamburg, Deutschland	nicht antibiotisch	A (1)	10	11
Cyclo-Spray	Chlortetracyclin-Spray	Albrecht GmbH Aulendorf, Deutschland	antibiotisch	B (2)	11	10
Repiderma	Kupfer-/Zinkchelate-Spray	Intracare Veghel, Niederlande	nicht antibiotisch	C (3)	11	10
Novaderma	Salicylsäure	WDT Garbsen, Deutschland	nicht antibiotisch	D (4)	11	10
Mortella Heal + Cyclo-Spray	Polyurethan-Wundauflage + CTC-Spray	Dr. Kenndoff GmbH & Co. KG Hamburg, Deutschland; Albrecht GmbH Aulendorf, Deutschland	antibiotisch	E (5)	11	10

Die **Gruppen B** und **E** erhalten Chlortetracyclin-Spray (CTC-Spray) als antibiotische Komponente. Während Gruppe B nur das CTC-Spray erhält, handelt es sich bei der Gruppe E um eine Kombination aus den Behandlungsformen der Gruppen A und B. Die 21 Tiere der **Gruppe A** erhielten im Anschluss an die erste Biopsieentnahme eine Polyurethan-Wundauflage auf die jeweilige M2-Läsion. Diese wurde, wie vom Hersteller gefordert, mit einem Verband versorgt. Primär werden Fesselbeuge, Kronsaum sowie Zwischenklauenspalt und Wundauflage mit einer synthetischen, nicht saugenden Watte gepolstert. Ein Schaumstoffkegel wird in die Watte direkt über der Wundauflage integriert. Dieser soll, je nach Läsionskonformation ausgerichtet, einen kontinuierlichen Druck und damit den Kontakt zwischen Wundfläche und Produkt gewährleisten. Ein selbsthaftender Verband bildet in mehreren Verbandslagen einen wasserabweisenden, äußeren Verband. Abschließend schützt ein auf den Verband aufgebrachtes Klebeband um die Fessel zusätzlich vor vorzeitigem Verlust.

Die Wundauflage wird nach 14 Tagen im Klauenstand kontrolliert entfernt und bei Bedarf direkt erneuert. Laut Herstellerangaben ist erst dann kein Bedarf für eine erneute Behandlung mehr gegeben, wenn keinerlei Anzeichen für ein M-Stadium mehr vorhanden oder die Haut unverletzt ist. Eine Stanzprobenentnahme für die Studie stellt eine erneute Zusammenhangstrennung der Hautbarriere dar. Die Folgebehandlung im Behandlungsprotokoll ist somit zwingend erforderlich. Da an Tag 14 und 28 die Verlaufsbiopsien entnommen wurden, erhielten die Studientiere der Gruppen A und E folglich nach jeder Biopsieentnahme einen erneuten Verband mit einer Polyurethan-Wundauflage für 14 Tage.



Abbildung 11: Behandlungsgruppen A-E mit applizierten Medikamenten vor Verbandsanlegung; F: Anlegen eines mit synthetischer Watte unterpolsterten Verbandes

In der **Gruppe B** (n=21 Tiere) wurden alle M2-Läsionen mit einem antibiotischen Chlortetracyclin-Spray (CTC-Spray) behandelt. Vor dem Einsatz des CTC-Sprays muss dieses laut aufgedruckter Packungsbeilage ausreichend geschüttelt werden.

Die Behandlungsanweisungen des Herstellers geben vor, eine Läsion für 3 Sekunden aus einem Abstand von 15-20 cm, bis zum Erreichen einer gleichmäßigen Färbung der besprühten Oberfläche, zu besprühen. Bei der Behandlung der DD soll dieses Vorgehen nach 30 Sekunden wiederholt und für 2-3 Tage 1x/Tag fortgeführt werden. Die Tiere der Gruppe B wurden an drei aufeinander folgenden Tagen gemäß den Angaben des Herstellers behandelt. Der Fabrikant gibt lediglich an, dass die Tiere nach der Behandlung an den Klauen trocken aufgestallt werden sollen. Zur Sicherstellung, dass das Produkt ausreichend lange mit der M2-Läsion in Kontakt bleibt und keine Sekundärinfektion an der Biopsieentnahmestelle auftritt, wurde bis zur Folgebehandlung ein unterpolsterter Verband (PW Bandagen, Vetrol Medical) angelegt. Zur Unterpolsterung diente synthetische Watte (Holthaus Medical, Remscheid). Tiere mit einer Verbandsbehandlung wiesen eine signifikant bessere Abheilungsrate als ausschließlich mit einem antibiotischen Spray behandelte Tiere ohne Verband auf (KLAWITTER et al., 2016). Aus diesem Grund sollten alle Studiengruppen gleichermaßen eine Verbandsbehandlung erhalten.

Die M2-Läsionen der Tiere der **Gruppe C** (n=21 Tiere) wurden ebenfalls mit einem Spray behandelt. Dabei handelt es sich in dieser Studiengruppe um ein nichtantibiotisches, mikronisierte Kupfer- und Zinkchelate enthaltendes Produkt. Der Hersteller gibt als Behandlungsempfehlung die Tage 0, 3 und 7 vor. Lediglich im Anschluss an die erste Spraybehandlung soll ein gepolsterter Verband angebracht werden. Nach kräftigem Schütteln der Spraydose wird die Läsion für 3 Sekunden aus einem Abstand von 15 cm besprüht, bis eine gleichmäßige Abdeckung der Oberfläche erfolgt ist. Anschließend wird jedesmal nach der Biopsieentnahme ein gepolsterter Verband (PW Bandagen, Vetrol Medical; Vliespolsterbinde: Holthaus Medical, Remscheid) angelegt.

Die 21 Tiere der **Gruppe D** erhielten nach der Biopsieentnahme eine nichtantibiotische Salicylsäure sowie Methylsalicylat enthaltende Paste auf die M2-Läsionen. Der Hersteller empfiehlt in Absprache die Paste ca. 5 mm dick gezielt auf die Läsion aufzubringen und anschließend mit einem Verband zu fixieren. Dieser im Anschluss angelegte und gepolsterte Verband (PW Bandagen, Vetrol Medical; Vliespolsterbinde: Holthaus Medical, Remscheid) wurde an Tag 6 wieder entfernt.

Das angewendete Behandlungsschema der **Gruppe E** (n=21 Tiere) entspricht weitestgehend dem Behandlungsschema der Gruppe A. Der deutliche Unterschied besteht hier in der zusätzlichen Applikation des CTC-Sprays auf die Läsion vor der Anwendung der Polyurethan-Wundauflage wie für Gruppe B beschrieben. Alle weiteren Arbeitsschritte sind identisch zu denen der Gruppe A.

An den Tagen 14 und 28 wurden die Läsionen nach der erneuten Biopsieentnahme in den **Gruppen B, C und D** mit dem jeweiligen Produkt der Gruppe sowie einem erneuten unterpolsterten Schutzverband (PW Bandagen, Vetrol Medical) versorgt. Zur Unterpolsterung diente synthetische Watte (Holthaus Medical, Remscheid). Diese wurden nach zwei Tagen mit einem Verbandsabnehmer wieder entfernt, während die Tiere im Fressgitter fixiert waren. In den **Gruppen A und E** verblieben die Verbände bis zur folgenden Biopsieentnahme.

4.2.6 Zeitlicher Ablauf

Ein Versuchszyklus erstreckte sich auf dem jeweiligen landwirtschaftlichen Betrieb über 45 Tage. In diesem Zeitraum wurden die behandelten Tiere täglich kontrolliert.

Tabelle 9: Darstellung des Versuchsablaufs zeitlich auf dem Betrieb und im Labor

	Labor	Tag	Betrieb	
1. Biopsie		0	1. Biopsieentnahme	1. Biopsie
	Biopsiehälfte 1 in Formalin/ 2 in OTEB	1	1. Nachbehandlung Gruppe B	
	Treponemen zählen im Dunkelfeld	2	2. Nachbehandlung Gruppe B	
	Biopsiehälfte 1 wässern	3	1. Nachbehandlung Gruppe C	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. 70% Ethanol	4	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. 96% Ethanol	5	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. Isopropanol	6	Verbandsabnahme Gruppe D	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. Xylol	7	2. Nachbehandlung Gruppe C	
	Biopsiehälfte 1 in 1er Paraffin	8	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 3er Paraffin	9	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 6er Paraffin	10	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 9er Paraffin	11	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 9er Paraffin eingebettet	12	2. Biopsieentnahme	
2. Biopsie	Biopsiehälfte 1 in Formalin/ 2 in OTEB	13	Kontrolle der Studientiere	2. Biopsie
	Treponemen zählen im Dunkelfeld	14	Verbandsabnahme Gruppe B, C, D	
	Biopsiehälfte 1 wässern	15	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. 70% Ethanol	16	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. 96% Ethanol	17	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. Isopropanol	18	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. Xylol	19	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1er Paraffin	20	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 3er Paraffin	21	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 6er Paraffin	22	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 9er Paraffin	23	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 9er Paraffin eingebettet	24	Kontrolle der Studientiere	
	Proben schneiden für die Histologie	25	Kontrolle der Studientiere	
	Proben schneiden für die Histologie	26	Kontrolle der Studientiere	
	Proben schneiden für die Histologie	27	Kontrolle der Studientiere	
3. Biopsie		28	3. Biopsieentnahme	3. Biopsie
	Biopsiehälfte 1 in Formalin/ 2 in OTEB	29	Kontrolle der Studientiere	
	Treponemen zählen im Dunkelfeld	30	Verbandsabnahme Gruppe B, C, D	
	Biopsiehälfte 1 wässern	31	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. 70% Ethanol	32	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. 96% Ethanol	33	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. Isopropanol	34	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1.+2. Xylol	35	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 1er Paraffin	36	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 3er Paraffin	37	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 6er Paraffin	38	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 9er Paraffin	39	Kontrolle der Studientiere	
	Biopsiehälfte 1 in 9er Paraffin eingebettet	40	Kontrolle der Studientiere	
	Proben schneiden für die Histologie	41	Kontrolle der Studientiere	
	Proben schneiden für die Histologie	42	Kontrolle der Studientiere	
	Proben schneiden für die Histologie	43	Kontrolle der Studientiere	
	Proben färben	44	Kontrolle der Studientiere	
		45	Kontrolle der Studientiere	

Jeder Versuchszyklus startet auf einem landwirtschaftlichen **Betrieb** an Tag 0 mit der funktionellen Klauenpflege der gesamten Herde. Klinisch gesunde Tiere, die über eine erfasste Krankheitsgeschichte der DD verfügen und an Tag 0 die Diagnose einer M2-Läsion erhalten, werden in den Versuch aufgenommen. Nach der randomisierten Zuordnung einer Behandlungsgruppe sowie einer fortlaufenden Versuchsnummer folgt die Entnahme des ersten Stanzbiopsates. Im Anschluss an die Fotodokumentation des Befundes wird die Läsion entsprechend des Behandlungsprotokolls versorgt. Neben der täglichen Kontrolle aller Studientiere folgt, je nach Behandlungsprotokoll des jeweiligen Herstellers der zu testenden Produkte, von Tag 1 bis Tag 12 die Nachbehandlung der Studientiere (siehe Tabelle). Hieraus ergibt sich eine intensive Arbeitsphase auf den Studienbetrieben in der ersten Studienwoche, gekoppelt mit dem zeitempfindlichen Arbeitsprotokoll des Labors.

An den Tagen 12 und 28 folgen die zweite sowie dritte Entnahme einer Verlaufsbiopsie aus den DD-Läsionen. Diese Folgebiopsate dienen zur Beurteilung des Heilungsverlaufs der an Tag 0 behandelten M2-Läsionen. Jeweils zwei Tage nach der zweiten und dritten Biopsieentnahme (Tag 14 und 30) wird in den Gruppen B, C und D der angebrachte Schutzverband abgenommen. Die Gruppen B, C und D werden somit an Tag 30 bereits aus der Versuchsphase wieder in den normalen Arbeitsablauf des Betriebes entlassen. Lediglich das Behandlungsprotokoll der Gruppen A und E sieht aufgrund der Behandlungsempfehlungen bei der eingesetzten Polyurethan Wundauflage eine verlängerte Verbandsbehandlung bis Tag 45 vor. Die 42 Tiere der beiden letztgenannten Gruppen werden somit nach gut sechs Wochen aus der Versuchsphase entlassen. Alle Tiere verbleiben sowohl über die gesamte Versuchsphase, innerhalb ihrer Herde in der gewohnten Umgebung, als auch nach Abschluss des Versuchs ohne Ausnahme auf dem entsprechenden Milchviehbetrieb.

Im Anschluss an die Probenentnahme auf dem Betrieb wurden die gekühlten Proben in ein **Labor** des Lehrstuhls für Anatomie, Histologie und Embryologie gebracht. Hier folgten die weiteren Schritte der Bearbeitung der Biopsien für die histologische Auswertung. Die Tabelle unter Punkt 4.2.1 zeigt schematisch den gemeinsamen Ablauf auf den landwirtschaftlichen Betrieben und im Labor über den Zeitraum der

Versuchsphase. An Tag 1 erfolgt als erster Bearbeitungsschritt das beschriebene senkrechte Teilen der Biopate mit dem Erhalt der Biopsiehälften I und II (siehe 4.2.3.2). Die darauffolgenden Arbeitsschritte des Schneidens und Färbens der Proben wurden teilweise an eine mitarbeitende biologisch-technische Assistentin (BTA) abgegeben. Im Anschluss an die aufsteigende Alkoholreihe von Tag 2 – Tag 10 folgte das stufenweise Vorbereiten der Proben für das Ausgießen in ein Paraffinblockchen an Tag 15. Die nun folgenden Arbeitsschritte hatten keinen zwingenden, zeitlichen Zusammenhang zur Entnahme der Proben mehr. Ein Sammeln der Probenblockchen für das folgende Schneiden und anschließende Färben der Schnitte für die histologische Auswertung war möglich.

4.2.7 Auswertung der makroskopischen Läsionsbeurteilung

4.2.7.1 Behandlungserfolg und Heilungsverlauf der Behandlungsgruppen

In der folgenden statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde die DD-Check App zur Berechnung und anschließenden graphischen Darstellung der Ergebnisse genutzt.

Nach der praktischen Erfassung der Daten im Stall über eine Nutzeroberfläche, folgt ein weiterer, webbasierter Teil der App. Hierüber werden die gewonnenen Daten zusammengefasst und anschließend statistisch sowie graphisch ausgewertet (TREMBLAY et al., 2016).

Über die einheitliche Erfassung der M-Stadien entstehen gleichmäßige, standardisierte Datensätze, die automatisierte Datenanalysen und die Trendberechnung der Entwicklung der M-Stadien ermöglichen. Man spricht von einer deskriptiven und prädiktiven, automatisierten Datenanalyse.

Die Vorhersagen basieren auf den stationären Verteilungen von Übergängen zwischen den DD-Stadien (M-Stadien und Chronizität) in einem klassenstrukturierten Markov-Kettenpopulationsmodell mit mehreren Stadien. Dieses Modell wird üblicherweise zum Modellieren von endemischen Krankheiten herangezogen (OTTO und DAY, 2007). Es liefert dem Benutzer die relativen Häufigkeiten von M-Stadien oder Anzeichen von Chronizität pro Bewertungsereignis und Vorhersagen von zukünftigen Häufigkeiten durch Anwenden des DD-Infektionsmodells. Die Nutzeroberfläche ermöglicht die Auswahl einzelner Wochen, die Anzahl

durchgeführter Bootstraps oder das Filtern nach bestimmten Variablen für die Aufteilung der Daten in Teilmengen. So können die Ergebnisse getrennt betrachtet werden.

Die automatische Datenumwandlung beginnt mit der Einführung einer Identifikationsnummer (ID) sowie der Transformation der Daten in Zeitintervalle pro Woche. Die Daten sind danach einzelnen Wochen zugeordnet und jeder Kuh ist basierend auf allen verfügbaren Datensätzen, ein Kuh-Typ zugeordnet. Zwei Datenpunkte sind die Mindestanzahl, die zum Definieren eines Kuh-Typs benötigt werden und minimal 15 Kühe müssen zeitgleich erfasst werden, um das Vorhersagemodell aktivieren zu können. Der endgültige Datensatz wird dann dem DD-Vorhersagemodell zugeführt und die Ergebnisse als Balkendiagramme dargestellt. Die vorhergesagten relativen Häufigkeiten von DD-Erkrankungszuständen basieren auf klassenstrukturierten Mehrzustands-Markov-Kettenmodellen. Die 95% Konfidenzintervalle der Vorhersagen werden mit Bootstrapping-Methoden generiert. Für jede Bootstrappzahl, die im Benutzereingabeabschnitt ausgewählt wurde, werden die IDs zufällig unterteilt, um eine Teilmenge zu erstellen. Jede Teilmenge wird dann für die Erstellung einer Vorhersage durch das DD-Vorhersagemodell geleitet. Die Varianz unter allen Vorhersagen der Teilmengen wird verwendet, um die 95% -Konfidenzintervalle der Vorhersagen pro M-Stadium oder Anzeichen für Chronizität zu erzeugen. Für die aktuelle Analyse wurden 15 Bootstraps verwendet. Die Ergebnisse in den Balkendiagrammen stellen graphisch die relativen Häufigkeiten der Krankheitsstadien pro Woche und die Projektion der Übergänge der M-Stadien pro Zeitintervall als zukünftige Entwicklung dar. Jeder Anteil enthält 95% Konfidenzintervalle als Fehlerbalken. Die Konfidenzintervalle können als indirektes Maß für die Signifikanz zwischen Wochen oder Gruppen verwendet werden. Konfidenzintervalle, die sich nicht überschneiden, sind ein Hinweis auf einen statistisch signifikanten Proportionsunterschied. Wenn sich die Konfidenzintervalle überschneiden, ist der Unterschied im Verhältnis nicht statistisch signifikant. Die Proportionen und Vorhersagen sind auch in Tabellenform unter jeder Grafik verfügbar. Es gibt vier Möglichkeiten oder Registerkarten, die Ergebnisse der Analyse zu untersuchen. Die Registerkarten sind Zusammenfassung nach M-Stufen, Zusammenfassung nach Anzeichen für Chronizität, Grafiken für ausgewählte Variablen, Tabellen mit M2-Kühen für Behandlungslisten.

4.2.7.2 Behandlungserfolg von akut- im Vergleich zu chronisch-erkrankten Tieren

In der folgenden statistischen Analyse der erhobenen Daten wurden die Programme R i386 3.4.3 (R CORE TEAM, 2017) und Excel 2016 zur Berechnung und anschließenden graphischen Darstellung der Ergebnisse genutzt.

Alle Behandlungsgruppen setzen sich aus 50% Typ-2 (akut erkrankt) und 50% Typ-3 Kühen (chronisch erkrankt) zusammen. Die differenzierte Betrachtung der Entwicklung der M-Stadien von der ersten zur zweiten Biopsieentnahme und von der ersten zur dritten Biopsieentnahme wurde sowohl auf Herdenebene mit allen Studientieren, als auch in jeder einzelnen Behandlungsgruppe durchgeführt. Um eine binäre Aussage treffen zu können, wurden zwei mögliche Entwicklungen nach der Erstbehandlung definiert. Eine positive Entwicklung, ausgehend von der M2-Läsion, beinhaltet den Übergang zu Stadien M0, M3, oder M4 und die negative Entwicklung bündelt Übergänge in die Läsionsstadien M1, M2, M4.1.

4.2.8 Kombinierte Auswertung der Makroskopie und Mikroskopie

In den folgenden statistischen Analysen der erhobenen Daten wurde das Programm R i386 3.4.3 zur Berechnung und anschließenden graphischen Darstellung der Ergebnisse genutzt.

4.2.8.1 Univariate Analyse

Die deskriptive oder auch univariate Analyse ist im Rahmen der Datenanalyse ein sehr wichtiger Schritt. Hierbei werden mögliche Fehler bei der Datenerhebung oder unerwünschte Ausreißer im Datensatz detektiert. Die univariate Analyse dient somit sowohl der Beschreibung des Datensatzes als auch zur Feststellung der Eignung der vorliegenden Datensammlung für folgende bi- und multivariate Analyseverfahren. Während dieses „Kennenlernens“ des Datensatzes wird sowohl ein Augenmerk auf die Häufigkeitsverteilungen als auch die Lage- und Streuungsmasse der Datenpunkte gerichtet.

Bei der Häufigkeitsverteilung numerischer Variablen können die Auswertungen die absolute oder relative Merkmalsausprägung darstellen. Hierfür können Daten auch in Gruppen zusammengefasst werden, wenn es viele Merkmalsausprägungen gibt. Dies führt zur besseren Lesbarkeit und Übersicht der univariaten Analyse. Ein gutes

Beispiel ist hierfür die Variable „DIM“ (Days in Milk) um die Verteilung der Kühe innerhalb der Laktation herauszustellen. Die 105 Datenpunkte der Studientiere werden in vier Gruppen eingeteilt.

Gruppe 1: Tag 0 – Tag 60

Gruppe 2: Tag 61 – Tag 120

Gruppe 3: Tag 121 – Tag 270

Gruppe 4: > Tag 270

Bei der Einführung dieser neuen Variablen, dem sog. „recoding“, spricht man von kategorischen oder Faktor-Variablen. Ein Beispiel für die Erstellung von Dummy-Variablen findet sich in den Daten der Dunkelfeldmikroskopie. Hier können die Ergebnisse zusammengefasst werden in 0= „OTEB enthält keine Treponemen“ und 1= „OTEB enthält Treponemen“. Dummy Variablen haben also nur 2 Kategorien, während kategorische Variablen multiple Kategorien haben können.

Die Darstellung der Datenanalysen erfolgt in Tabellenform oder graphisch mit Hilfe von Balken- oder Kreisdiagrammen. Für die graphische Abbildung der Verteilung stetiger Variablen finden Histogramme ihre Anwendung.

4.2.8.2 Multivariate Analyse

In der multivariaten Analyse werden alle für die vorliegende Analyse relevanten Parameter in die Betrachtung mit einbezogen. Nach erster Analyse der Datenlage wurden weitere Tests durchgeführt, um die Zusammenhänge der Variablen darzustellen.

Ziel der Analyse war es, den Einfluss der 5 verschiedenen Behandlungsmethoden auf den Behandlungserfolg zu ermitteln. Aufgrund der großen Anzahl verschiedener Erfolgsdefinitionen, wie makroskopische Beurteilung, Dunkelfeldmikroskopie, Histologie etc. (s. 4.2.2 und 4.2.3) wurde in der statistischen Auswertung jedoch die Behandlungsgruppe als Zielvariable gesetzt und die Relevanz sowie die Stärke des Zusammenhangs der verschiedenen Erfolgsdefinitionen in Bezug zur Behandlungsgruppe untersucht.

4.2.8.2.1 Bayesian Network

Im Bayesian Network sollten zunächst die relevanten Erfolgsdefinitionen als Parameter für ein folgendes Berechnungsmodell ermittelt werden. Bayesian Networks (BN) oder auch Bayes-Netze sind auch als Glaubensnetzwerke bekannt und gehören zur Familie der graphischen Modelle (GM). Über diese graphische Darstellungsform kann Wissen über eine unsichere oder gar unbekannte Domäne dargestellt werden.

Alle Variablen werden in einem großen Netzwerk als Knotenpunkte dargestellt. Jeder Knoten in dem Graphen repräsentiert eine Zufallsvariable des jeweiligen Datensatzes. Die zwischen den Knotenpunkten liegenden Kanten oder Pfeile verkörpern direkte Wahrscheinlichkeitsabhängigkeiten zwischen den integrierten Zufallsvariablen und stellen eine statistische Abhängigkeit dar (RUGGERI et al., 2007). In „directed networks“ gibt die Pfeilrichtung an, welche Variable beeinflusst (Elternteil) und welche Variable unter Einfluss steht (Kind). Auf diese Weise können Nachkommen bestimmt werden. Hierunter versteht man die Menge an Knoten, die über einen direkten Weg einer Ausgangsvariablen erreicht werden können. Aus der entgegengesetzten Betrachtungsrichtung (entgegen der Pfeilrichtung) entstehen Vorfahren einer Gruppe von Nachkommen. Die Summe der Eltern, Nachkommen und Kindern heisst „Markov Blanket“ (NAGARAJAN et al., 2013). Eine Grundvoraussetzung für BN ist die Azyklie. Hieraus resultiert die Sicherheit, dass kein Knoten sein eigener Vorgänger oder Abkömmling sein kann.

Im Bayesian Netzwerk werden dann direkt die mit der Variable „Group“ (Behandlungsgruppe) eng in Verbindung stehenden und in der Nachbarschaft vorkommenden Variablen analysiert, um die große Zahl der vorliegenden Variablen für die weitere Bearbeitung in der logistischen Regression einzugrenzen. Dieses Vorgehen nennt man „variable selection“, ein Teil des Machine Learning.

4.2.8.2.2 Logistische Regression

Nach der Ermittlung der für die Behandlungsgruppe relevanten beeinflussenden Parameter im BN, wurde eine logistische Regression mit der Zielvariable Group (Behandlungssgruppe) aus diesen Parametern erstellt.

Alle Behandlungsgruppen wurden einzeln mit der Gruppe B verglichen. Die der Studie zugrundeliegende statistische Berechnung der nötigen Probenzahl, beinhaltet

die Hypothese, dass eine nicht antibiotische Behandlung für eine erfolgreiche Behandlung mindestens genauso gut sein muss, um eine Berechtigung auf Anwendung zu haben. Aus diesem Grund wurden die Gruppen jeweils paarweise verglichen.

Bei der Durchführung modelliert die logistische Regression die Wahrscheinlichkeit, dass die Antwort (Y) zu einer bestimmten Kategorie (Bsp.: ja/nein) gehört und modelliert nicht Y direkt (JAMES et al., 2015). Aus der Regression entsteht eine Formel, mit deren Hilfe die einzelne Wahrscheinlichkeit (sog. „odds“) berechnet werden kann, sodass ein angegebener Fall positiv ist:

$$F(z) = 1 / (1 + e^{-z})$$

In diesem Fall setzt sich z aus der Konstanten a, dem Prädiktor X und dem jeweils zugehörigen Koeffizienten b zusammen:

$$z = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n + \varepsilon$$

Für die Anpassung des vorliegenden Modells wird die Methode des Maximum-Likelihood-Schätzverfahren angewendet. Hierbei werden die optimalen Werte sowohl für die Koeffizienten b als auch die Konstante a und Residualwerte ε ermittelt, sodass die Formel mit der höchsten Wahrscheinlichkeit die beste Vorhersage des beobachteten Wertes ergibt. Dieses Schätzverfahren wird iterativ durchgeführt. Dabei wird schrittweise mit Hilfe von „trial and error“ das jeweilige Ergebnis des vorherigen Schrittes so lange verbessert, bis keine weitere Steigerung des Ergebnisses mehr möglich ist. Die so erhaltenen, geschätzten Werte aus dem letzten Schätzschritt können dann in die Formel integriert werden. Niedrige Bilanzen werden immer nahe an der 0 aber nie gleich Null vorhergesagt. Korrelierend werden hohe Bilanzen immer nahe 1 aber nie gleich 1 geschätzt. So wird die logistische Funktion immer als eine S-förmige Kurve abgebildet und man erhält unabhängig vom x-Wert eine vernünftige Vorhersage.

Die Multiple logistische Regression betrachtet das Problem der Vorhersage einer binären Antwort mit mehreren Vorhersagevariablen. Bei der Vorhersage von Ereignissen müssen oft mehrere Variablen in die Betrachtung einer Zielvariablen mit einbezogen werden. Die unterschiedlichen, mit einbezogenen Informationen, von denen angenommen wird, dass sie das vorherzusagende Phänomen beeinflussen, nennt man Prädiktorvariablen oder Prädiktoren. Sie sind der Ausgangspunkt für die zu bearbeitende Vorhersage.

Zur Darstellung der Ergebnisse der logistischen Regression wurden **Forest plots** verwendet. Hierzu werden die Koeffizienten statistisch signifikanter Variablen aus der vorangegangenen Berechnung exponentiert und mit Hilfe der Odd ratios und ihren 95% Konfidenzintervallen graphisch dargestellt.

Die graphische Darstellung einer zusammenfassenden Analyse einer oder mehrerer Studienteile erfolgte in Form eines Forest plots. Hierbei werden die Einzelergebnisse in Form eines prominenten Punktes auf einer horizontalen Achse abgebildet. Das Ergebnis kann hierbei ein Alters-Mittelwert einer Population, eine prozentuale Verteilung einer Heilungsrate oder eine beliebig gewählte Variable sein. Die den Punkt vertikal durchziehende Linie zeigt über die Länge die Streubreite der Datenpunkte, ihre Varianz oder das Konfidenzintervall an. Dieser Graph bietet so die Möglichkeit, komplexe Sachverhalte in einer Abbildung zu bündeln. Ein Forest plot kann durch seinen Aufbau auch als ein modifizierter Boxplot angesehen werden.

Die Begrifflichkeit entstand aus der Idee, dass der Forest plot als Bild über die vielen parallelen Linien einer Baumschule oder einem Wald ähneln könnte.

Averaged Bayesian Networks sind eine weitere Variante der Analyse der BN. Um die Richtung des Zusammenhangs zwischen Behandlungsgruppe und den einzelnen Parametern aus 4.2.8.2.2 zu ermitteln, wurde diese Methode angewendet.

Über das Verfahren des Bootstrappings wird analysiert, in welche Richtung zwischen zwei Variablen über 80% der Ergebnisse liegen. Dies bestimmt dann die angezeigte Pfeilrichtung und stellt eindrücklich dar, welche Variable einen Einfluss ausübt und welche Variable von einer oder mehreren verschiedenen Variablen beeinflusst wird.

Der Prozess des „averaging“ setzt einen Grenzwert für die % Anwesenheit der Knoten in den BCN während der bootstrapping Zyklen.

5 Ergebnisse

5.1 Datenerfassung

Die Vorarbeit vor Studienbeginn für das Auffinden der passenden Studientiere und die Erstellung der notwendigen Krankheitshistorien der Kühe, begann 2014 und erstreckte sich je nach Betrieb durchschnittlich über 14 Monate (6-30 Monate). Hierbei wurden im Rahmen der Befunderhebung bei der Routineklauenpflege insgesamt 20.864 Klauen auf fünf Betrieben befundet.

Insgesamt wurden 110 Tiere in die Studie aufgenommen. Fünf Tiere wurden aus dem Versuch im Verlauf ausgeschlossen und 105 Tiere wurden in die Auswertung aufgenommen. Drei Tiere (Kuh Nr. 12,33,86) entwickelten an einem Fuß, der nicht der Probenentnahme diente, eine Phlegmone und wurden mit einer systemischen Antibiose behandelt. Eine Kuh (Kuh Nr. 17) wurde infolge einer frakturierten Beckengliedmaße euthanasiert. Eine weitere Kuh (Nr. 80) wurde aus wirtschaftlichen Gründen in der Versuchsphase geschlachtet.

Tabelle 10: Rasseverteilung der Studientiere

Rasse	Holstein Friesian	Red Holstein	Fleckvieh	Braunvieh
Anzahl Tiere (%)	50 (47,6)	46 (43,8)	7 (6,7)	2 (1,9)

Tabelle 11: Verteilung der Tiere je Studienbetrieb

Betrieb	Betrieb 1	Betrieb 2	Betrieb 3	Betrieb 4	Betrieb 5
Anzahl Tiere (%)	60 (57,1)	21 (20,0)	12 (12,0)	6 (5,7)	6 (5,7)

5.1.1 Auswertung der makroskopischen Läsionsbeurteilung

Die graphische Auswertung der M-Stadien über den Studienverlauf wurde mit Hilfe der DD Check App durchgeführt. Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf mit Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme) und der vom Transitionsmodell vorhergesagten Tendenz für die Folgewochen (Pred.=Prediction). Hinzu kommt die Gruppierung in die sechs unterschiedlichen M-Stadien. Im Graphen wird das M-stage 5 synonym für die M4.1 Stadien verwendet.

5.1.1.1 Behandlungserfolg und Heilungsverlauf der Behandlungsgruppen

Die DD Check App wertet die eingegebenen Daten hinsichtlich der Entwicklung der M-Stadien (Behandlungserfolg) und der Entwicklung der Anzeichen von Chronizität (Heilungsverlauf) aus.

5.1.1.1.1 Behandlungserfolg

Die von der DD Check App ausgegebene graphische Auswertung der Entwicklung der M-Stadien über den Studienverlauf kann auf Herdenebene oder in den einzelnen Behandlungsgruppen erfolgen. In der Herdenbetrachtung stechen drei Entwicklungen bis Tag 28 heraus. Der gewollte Abfall der M2-Läsionen im Anschluss an eine Behandlung von 100% auf knapp 23% mit abfallender Tendenz auf unter 20%, der Anstieg der M4-Läsionen von 0% auf 40% mit ggr. steigender Tendenz auf knapp 42% und der Anstieg der M4.1-Läsionen von 0% auf 30% mit ggr. steigender Tendenz auf gut 31%. Der Anteil an Tieren ohne jegliche Anzeichen von DD ist mit 1% sehr gering.

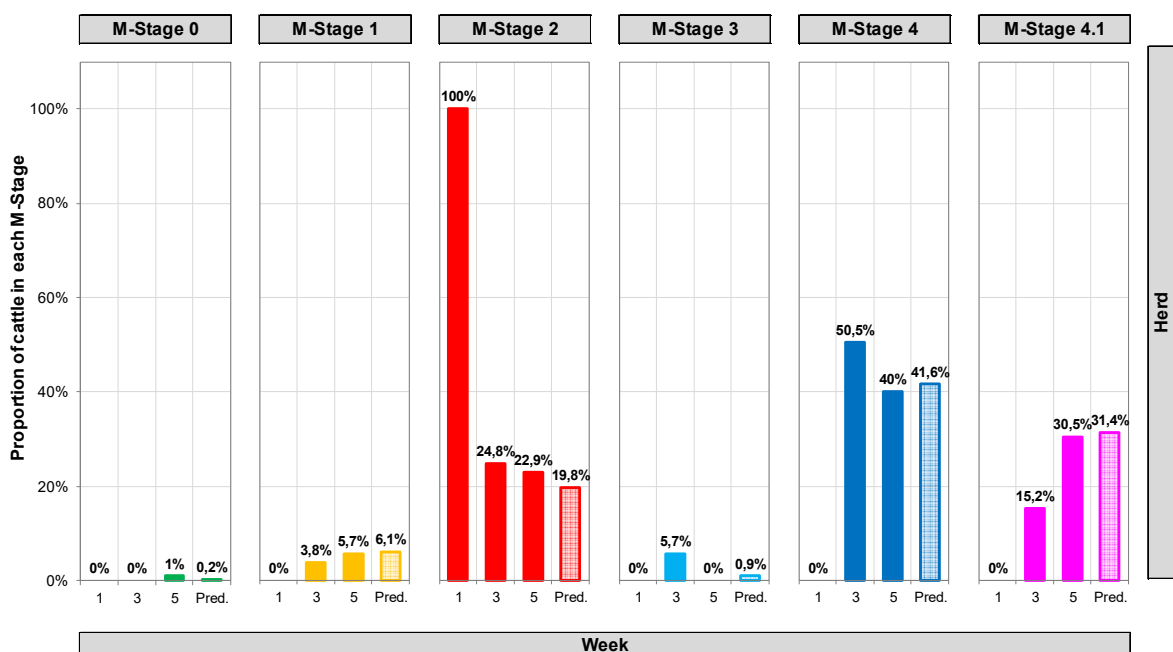


Abbildung 12: Verteilung der M-Stadien aller Behandlungsgruppen (A-E); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=105 Kühe aus 5 Betrieben

In der genaueren Betrachtung des Behandlungserfolges ist die einzelne Betrachtung der Behandlungsgruppen notwendig, um die herausgestellten Herdentrends gezielt einer Behandlungsgruppe zuordnen zu können. In den folgenden Graphiken werden die Heilungsverläufe der Gruppen A-E dargestellt.

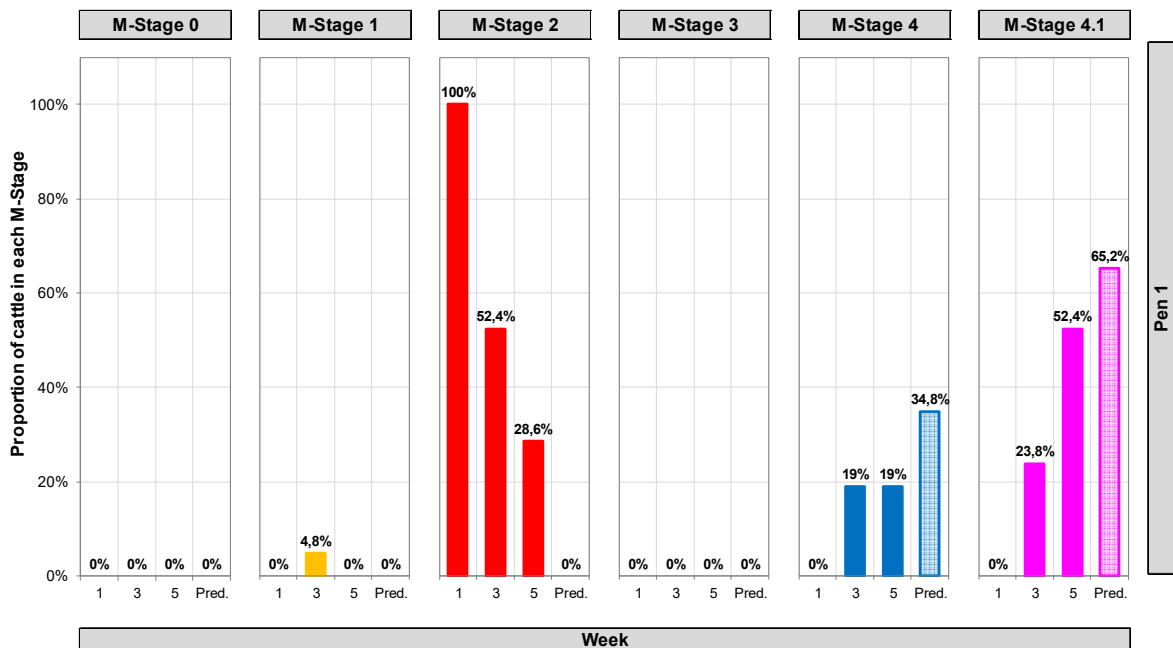


Abbildung 13: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen A (Pen 1); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben

Die Graphik der **Gruppe A** (Pen 1) zeigt einen stufenweisen Abfall der M2-Läsionen von 100% auf knapp 29% an Tag 28 mit anschließender weiter fallender Tendenz gen 0%. Hinzu kommt aber ein deutlicher, kontinuierlicher Anstieg der M4.1 von 0% auf 52% an Tag 28 mit deutlich steigender Tendenz auf 65%. Die M4 Läsionen sind über die Versuchsdauer konstant auf 19%, in der Tendenz aber mit einem deutlichen Anstieg auf 35% abgebildet. Die Vorhersage der Entwicklung nach Tag 28 ist: deutlicher Anstieg von M4 und M4.1 Läsionen.

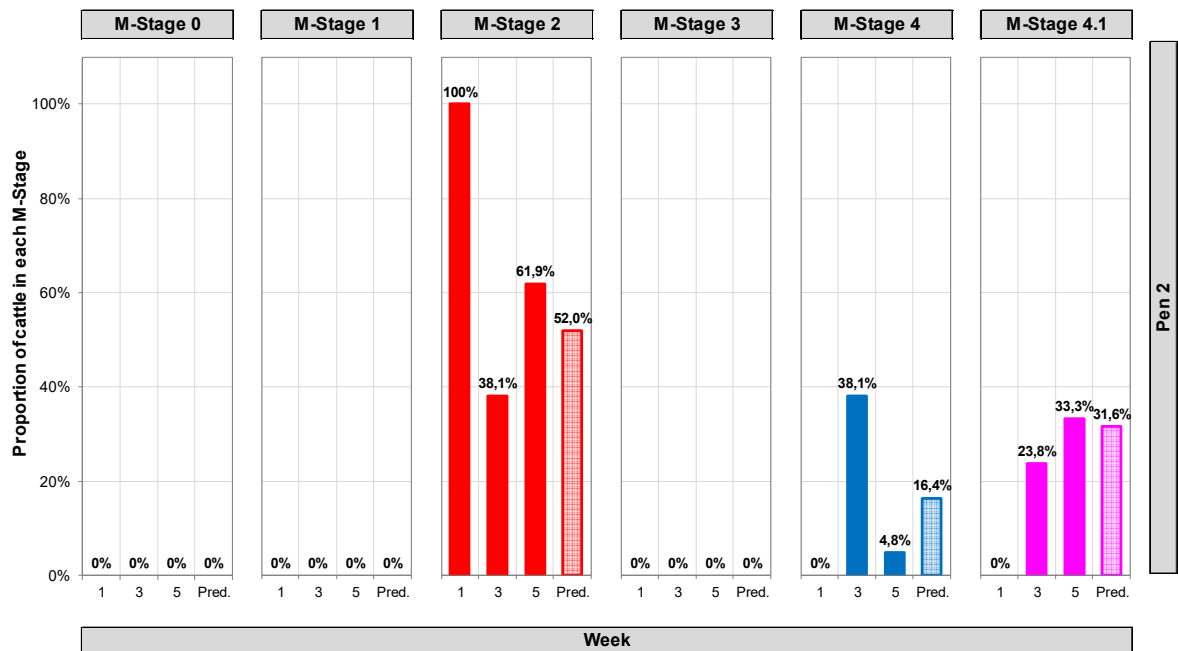


Abbildung 14: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen B (Pen 2); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben

Die Ergebnisse der **Gruppe B** (Pen 2) zeigen nach der Behandlung zwar einen Abfall der M2-Läsionen auf 38% an Tag 14, aber insgesamt nur eine geringe Reduktion um 38% an Tag 28 mit ggr. fallender Tendenz auf 52%. Einhergehend mit dem deutlichen Absinken der M2-Läsionen an Tag 14, steigen die M4-Läsionen auf 38% an. Zum Studienende befinden sich die M4-Läsionen aber nur noch auf knapp 5 % mit steigender Tendenz. Lediglich die M4.1-Stadien zeigen einen kontinuierlichen Anstieg im Verlauf der Studie auf ein Drittel der Gesamtzahl mit gleichbleibender Tendenz. Die Vorhersage der Entwicklung nach Tag 28 ist: ggr. Anstieg von M4 und deutlicher Anstieg der M4.1 Läsionen.

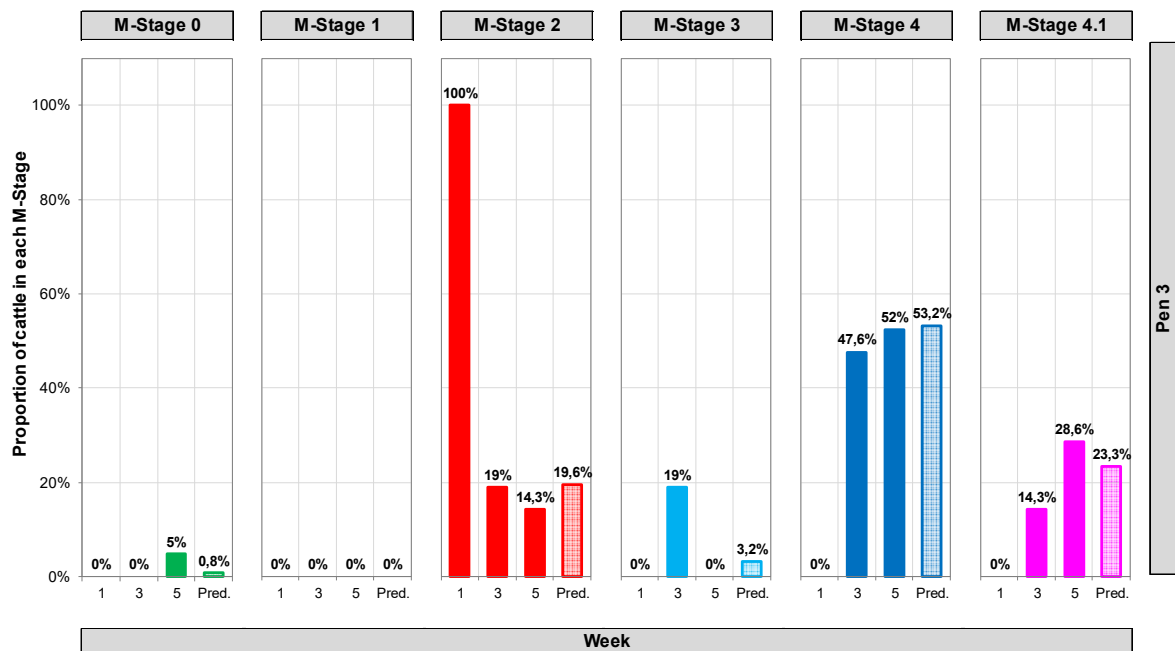


Abbildung 15: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen C (Pen 3); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben

Die Ergebnisse der **Gruppe C** (Pen 3) stechen aus der zusammengestellten Graphik der ersten drei Behandlungsgruppen hervor. Einhergehend mit einem deutlichen Abfall der M2-Läsionen bis Tag 28 auf gut 14% mit einer ggr. Steigungstendenz auf unter 20% steigen die M4-Läsionen stabil auf knapp 53% an und weisen eine ggr. Steigungstendenz auf. Nach einem Anstieg auf knapp 29% an Tag 28 zeigen die M4.1-Läsionen wieder eine abfallende Tendenz auf 23%. Bis Tag 14 steigen die M3-Läsionen einmalig auf knapp 20% an. Vorhersage der Entwicklung nach Tag 28 ist: augenscheinlich gleiches Niveau an M4 Läsionen und kein Anstieg der M4.1 Läsionen.

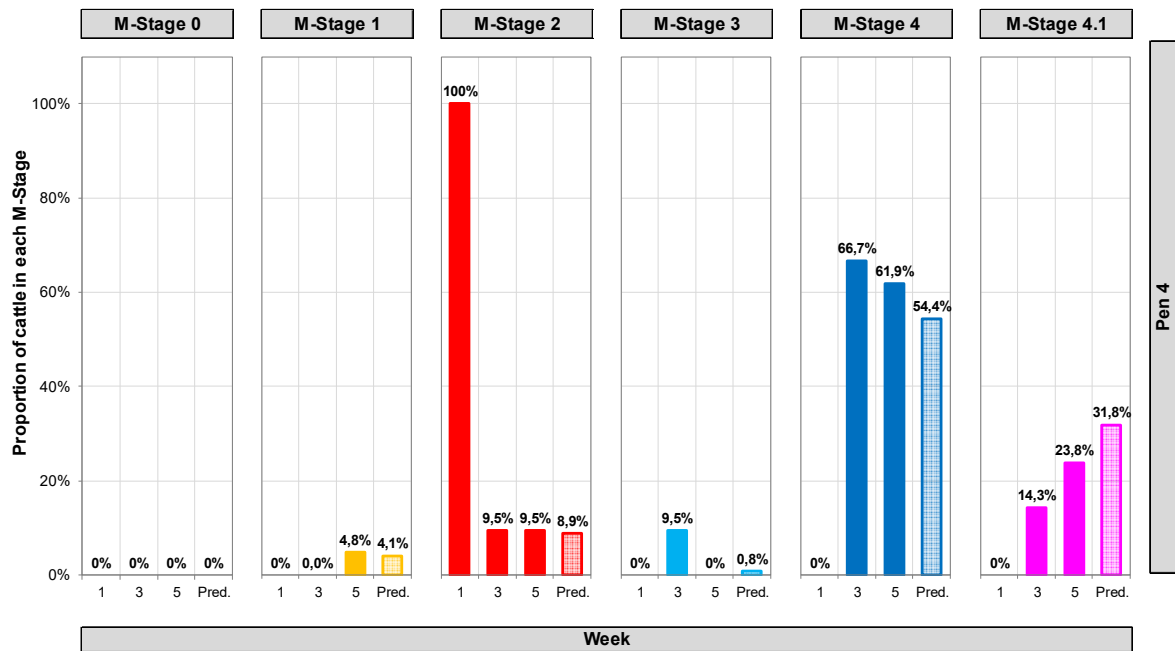


Abbildung 16: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen D (Pen 4); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben

In der **Gruppe D** (Pen 4) sinken die M2-Läsionen am Tag 14 auf knapp unter 10% ab und verbleiben auch in der Folgetendenz auf diesem Niveau, was auf Heilung weist. Bis Tag 14 gibt es einen Anteil von knapp 10% an Tieren, die eine M3-Läsion aufweisen. Die M4-Stadien halten sich auf einem hohen Niveau bei über 60% mit einer leicht abfallenden Tendenz. Lediglich die M4.1-Läsionen weisen einen stetigen Anstieg bis Tag 28 auf 24% mit einer steigenden Tendenz auf knapp ein Drittel auf. Vorhersage der Entwicklung nach Tag 28 ist: gleichbleibende Rate M4 und Anstieg der M4.1 Läsionen.

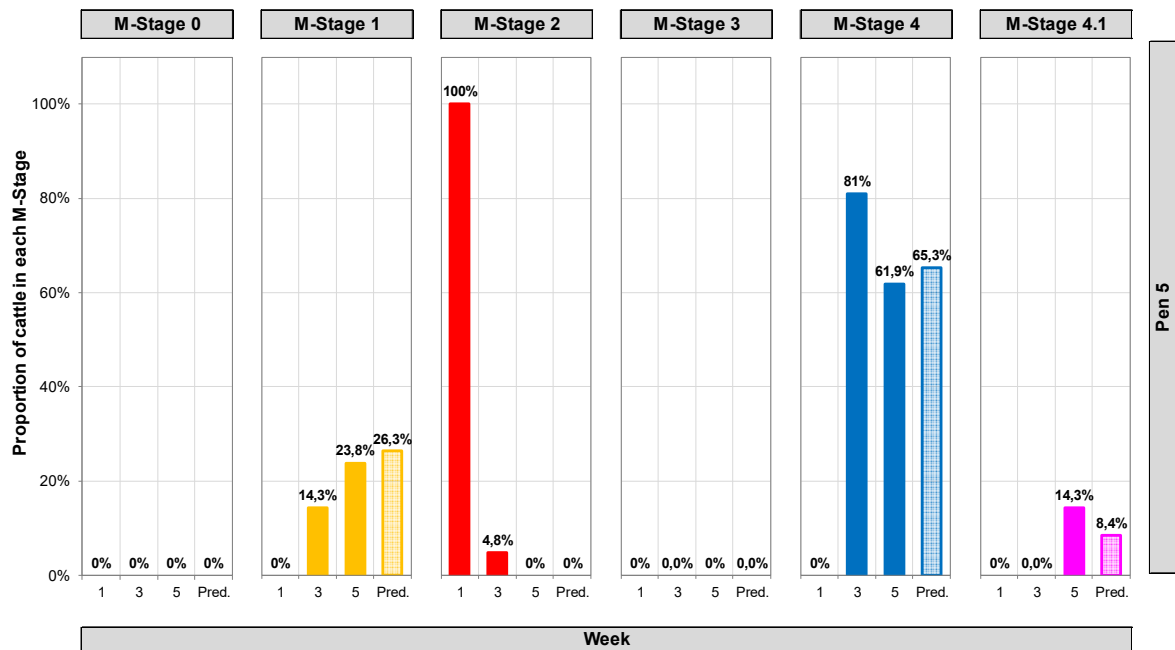


Abbildung 17: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen E (Pen 5); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben

Dieser Darstellung angeschlossen sinkt der Anteil an M2-Läsionen in **Gruppe E** (Pen 5) auf 0% mit einer dort verbleibenden Tendenz ab. Der Anteil an M4-Läsionen steigt anfänglich auf über 80% an und entwickelt sich anschließend auf ein Niveau oberhalb der 60% Grenze. Von Tag 14 auf Tag 28 entwickelt sich ein geringer Anteil von 14% an M4.1-Läsionen mit einer abfallenden Tendenz. Eine stetig ggr. ansteigende Entwicklung zeigt sich bei dem Anteil der M1-Läsionen auf ein Viertel bis Tag 28 mit einer weiter steigenden Tendenz. Vorhersage der Entwicklung nach Tag 28 ist: gleichbleibende Rate M4 und ggr. Abfall der M4.1 Läsionen.

5.1.1.1.2 Heilungsverlauf

Mit der Auswertung der Daten über die DD Check App kann man den Verlauf der Anzeichen einer chronischen DD Läsion (Hyperkeratosen, Proliferation) graphisch darzustellen.

Der Herdenüberblick zeigt einen nahezu deckungsgleichen Abfall über die Versuchszeit der proliferativen Läsionen sowie der Läsionen ohne Anzeichen auf ein chronisches Krankheitsgeschehen auf um die 7%. Die Hyperkeratosen steigen kontinuierlich auf über 80% an und weisen auf eine gleichbleibende Tendenz hin.

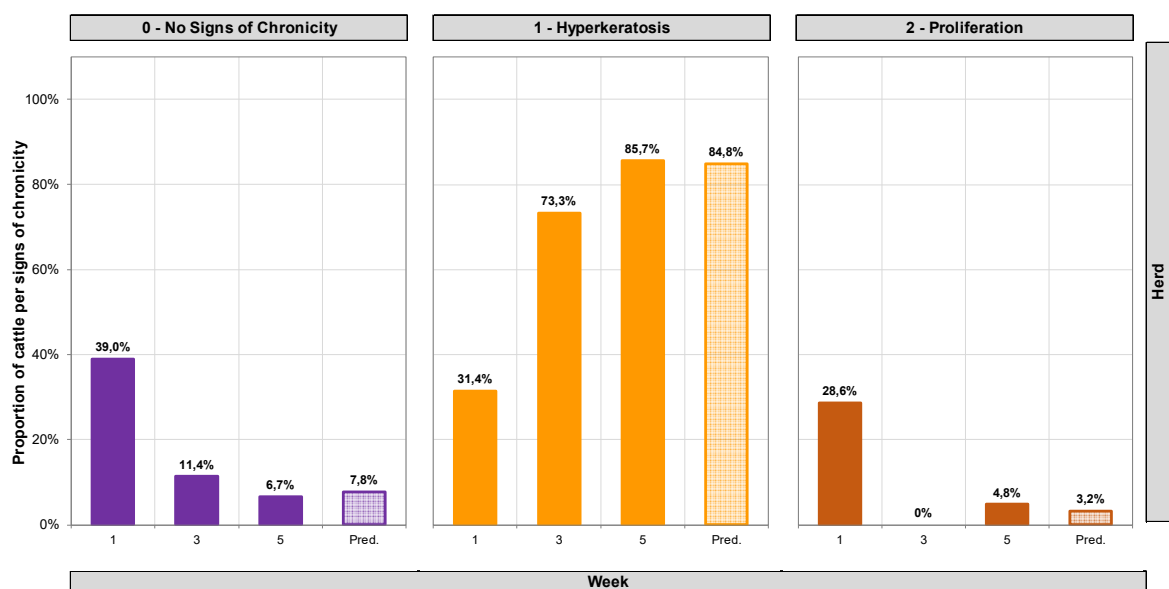


Abbildung 18: Entwicklung der Chronizität aller Behandlungsgruppen (A-E); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=105 Kühe von 5 Betrieben

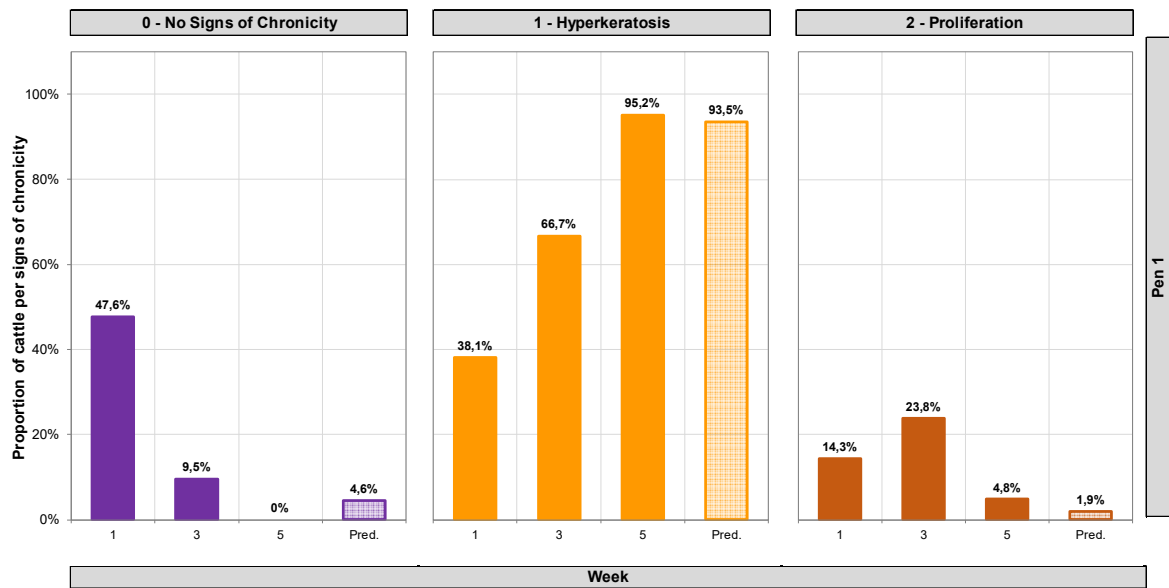


Abbildung 19: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (A) ; Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben

Auch unter diesem Auswertungspunkt werden die Unterschiede erst in der Einzelbetrachtung deutlich.

Die **Gruppe A** zeigt neben einem Abfall der von Chronizität freien Läsionen von knapp 50% auf 0%, einen Anstieg der Hyperkeratosen auf deutlich über 90% und einer Verlaufstendenz, die in diesem Bereich bleibt. Nach einem zwischenzeitlichen Anstieg der proliferativen Läsionen auf 24% fallen diese mit weiter absinkender Tendenz auf 5%.

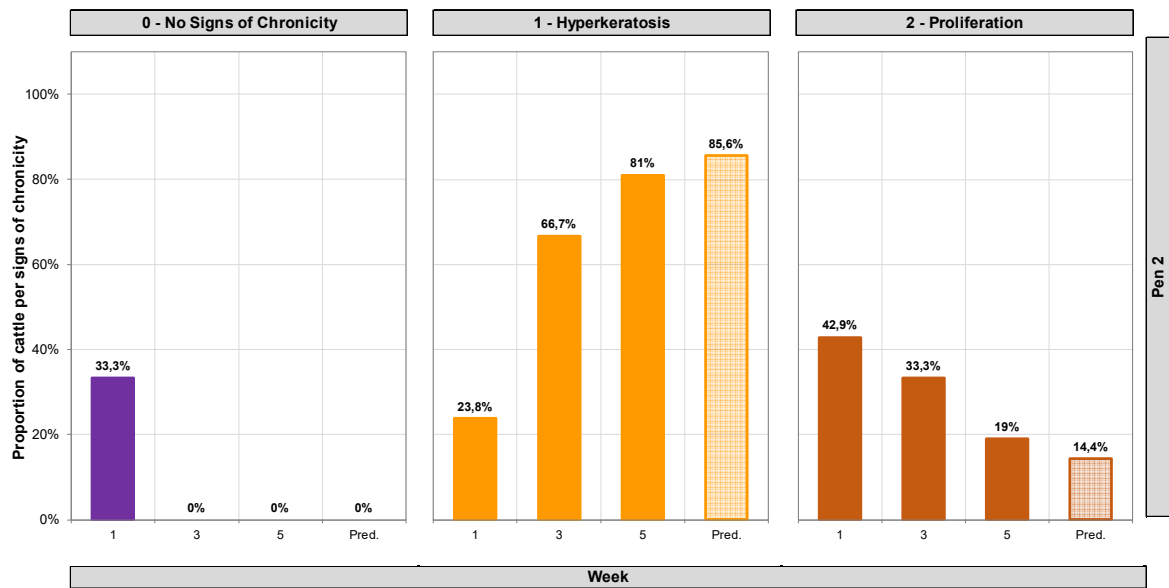


Abbildung 20: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (B);). Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben

In der **Gruppe B** sinkt der Anteil der von Chronizität freien Läsionen direkt auf 0% ab und verbleibt auf diesem Niveau. Die Hyperkeratosen steigen kontinuierlich mit weiter steigender Tendenz auf über 80% an. Ein stetiger Abfall auf unter 20% zeichnet sich bei dem Anteil der Proliferationen ab.

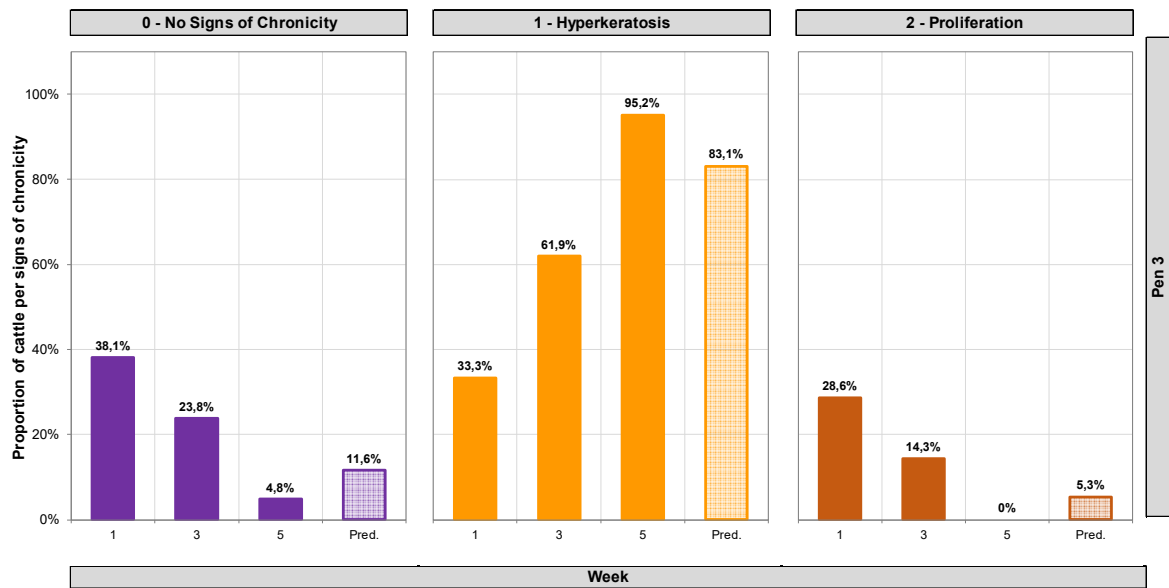


Abbildung 21: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (C); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben

Bei der **Gruppe C** fällt der Anteil der Läsionen ohne Anzeichen von Chronizität von knapp 40% auf unter 5% ab. Die proliferativen Läsionen sinken auf 0% ab, verzeichnen jedoch eine ggr. Tendenz der Steigung auf 5%. Die Hyperkeratosen steigen über einen Anteil von 95% an und bleiben in der Tendenz über 80%.

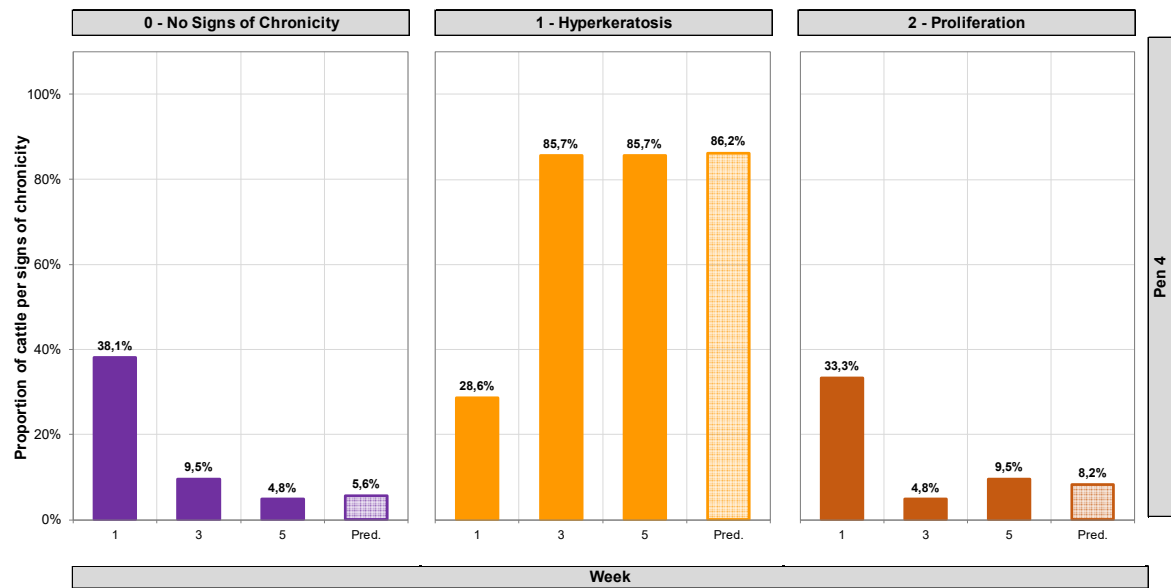


Abbildung 22: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (D); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben

Bei **Gruppe D** fällt der Anteil der von Chronizität freien Läsionen auf 5% ab. Die Hyperkeratosen steigen stabil auf über 85% an und verbleiben dort tendenziell. Nach einem Abfall unter 5% steigen die proliferativen Läsionen wieder auf knapp 10% an und verbleiben dort

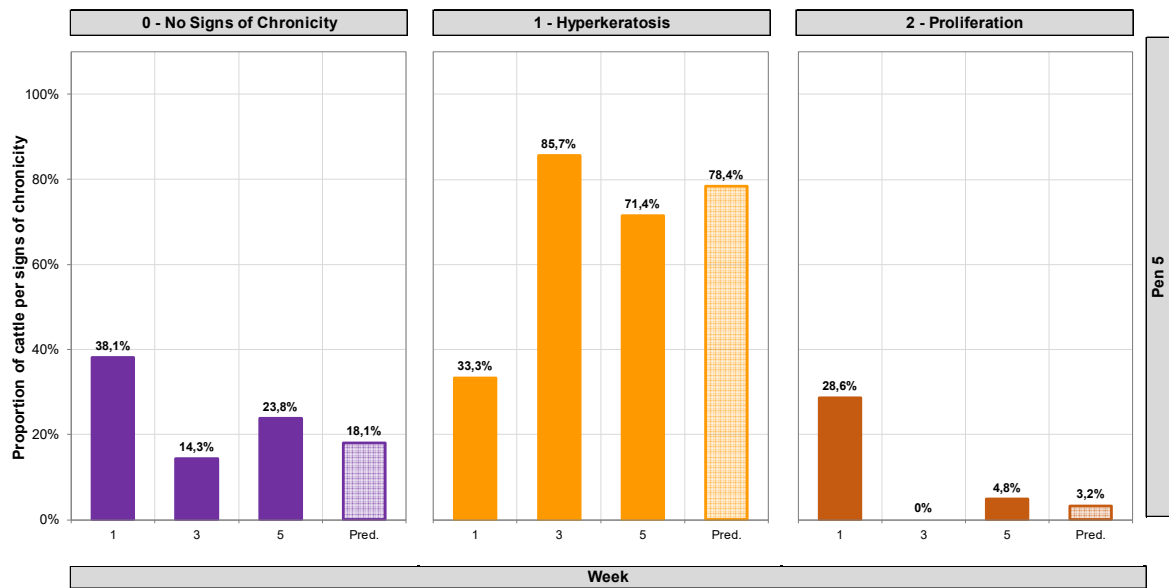


Abbildung 23: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (E); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben

Der Anteil der von Chronizität freien Läsionen sinkt in der **Gruppe E** anfänglich stärker (14%) ab, steigt jedoch anschließend wieder auf knapp ein Viertel an. Die Hyperkeratosen pendeln sich nach einem Anstieg auf 86% bei über 70% ein. Die Proliferationen sinken direkt deutlich ab und verbleiben bei unter 5%.

5.1.1.2 Behandlungserfolg von akut- im Vergleich zu chronisch-erkrankten Tieren

Die in der DD Check App herausgearbeiteten prozentualen Verteilungen der M-Stadien im Behandlungserfolg, wurden für die folgende Berechnung und graphische Darstellung erneut herangezogen. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wurden die M-Stadien für die Auswertung in einen positiven (M0, M3, M4) und negativen (M1, M2, M4.1) Behandlungsausgang gruppiert. Zusätzlich wurde jede Behandlungsgruppe in die anfänglich etablierten Untergruppen der Kuh-Typen (Typ-2 und Typ-3) gegliedert. Die Betrachtung des Behandlungserfolgs wurde im Verlauf sowohl für Tag 14, als auch für Tag 28 durchgeführt.

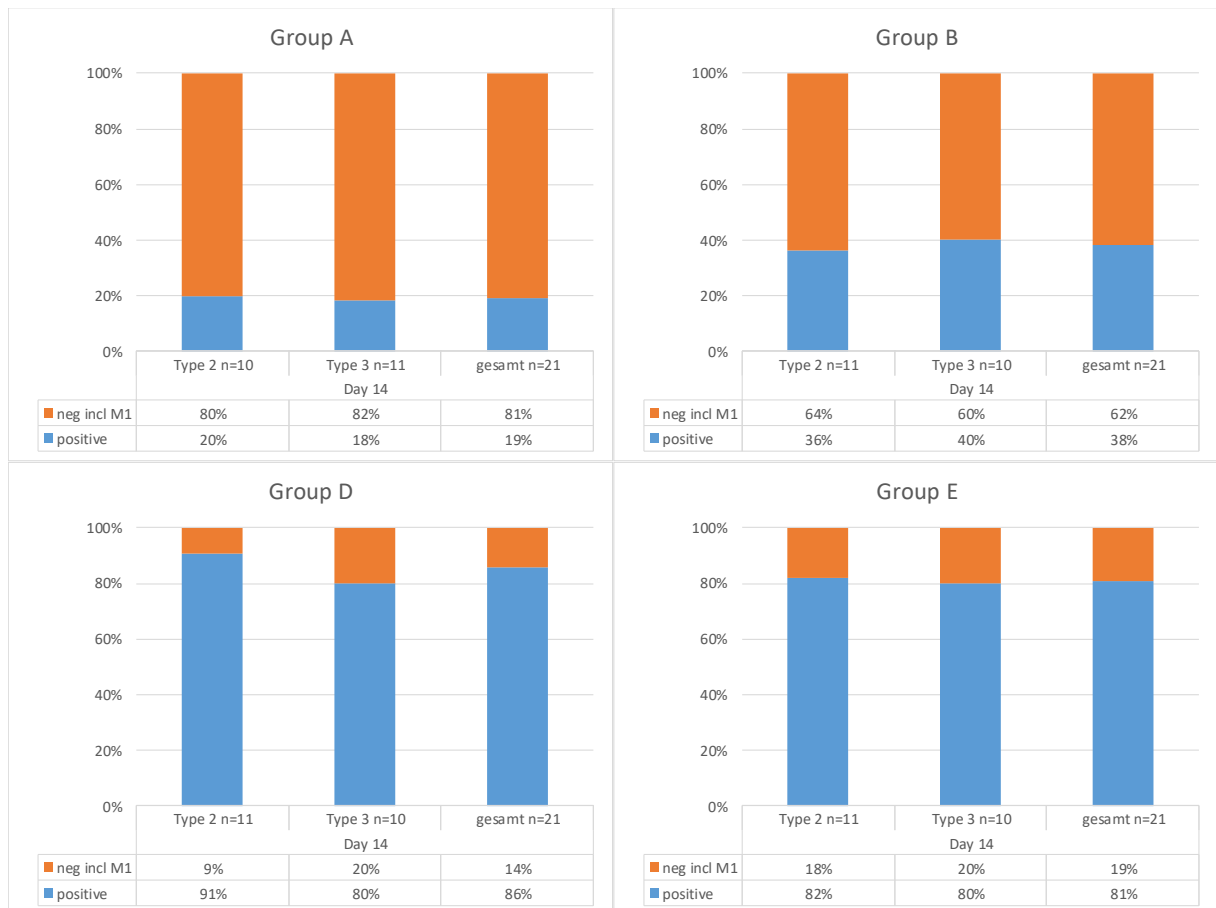


Abbildung 24: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 14 der Gruppen A,B,D,E aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = $M_0+M_3+M_4$; neg incl M1 = $M_1+M_2+M_4.1$

Die Gruppen A, B, D und E können in ihrer Ergebnisbeschreibung zusammengefasst werden. Innerhalb der Gruppen zeigt sich kein deutlicher Unterschied des Behandlungserfolgs bei der Behandlung einer Typ-2 gegenüber einer Typ-3 Kuh. Das gemeinsame Niveau der Kuh-Gruppen ist innerhalb der Behandlungsgruppe ausgewogen. Deutliche Unterschiede sind aber in der Gesamtbetrachtung der Gruppen herauszustellen. Während **Gruppe A** unter 20% und **Gruppe B** 38% einen positiven Behandlungsausgang an Tag 14 aufweisen, stehen **Gruppe D** und **E** mit über 80% den beiden anfänglichen Gruppen gegenüber.

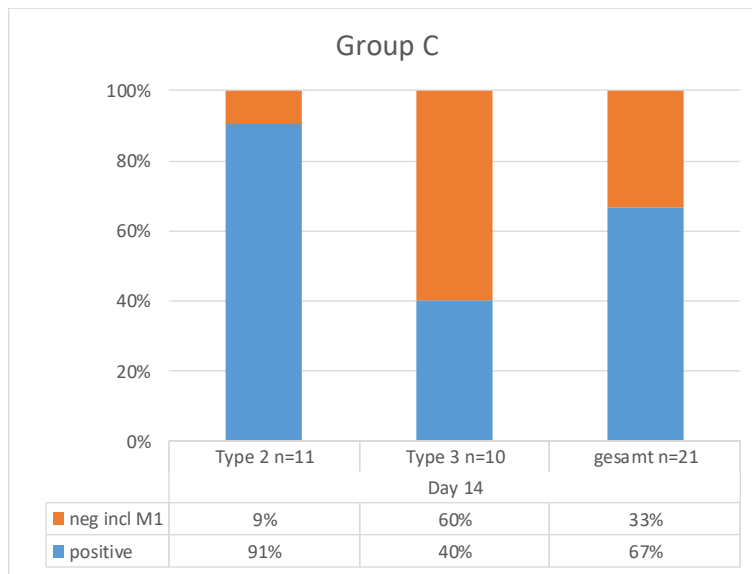


Abbildung 25: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 14 der Gruppe C aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = M0+M3+M4 ; neg incl M1 = M1+M2+M4.1

Die **Gruppe C** kann im Gesamtergebnis mit knapp 70% unter Gruppe D und E angesiedelt werden. Im Vergleich der beiden Kuh-Typ-Gruppen zeigt sich ein deutlicher Unterschied von über 50% in dem Ergebnis des positiven Behandlungserfolges. Typ-2 steht mit 91% positiver Entwicklung dem Typ-3 mit lediglich 40% gegenüber.

Zur Überprüfung ob es sich bei diesem Unterschied zwischen dem Resultat der beiden Kuh-Typen um ein statistisch signifikantes Ergebnis handelt, wurde eine Vierfeldertafel berechnet. Da ein Quadrant < 5 ist, wurde der Fisher exact Test angewendet. Der p-Value ist $< 0,05$. Somit handelt es sich um einen statistisch signifikanten Unterschied im Behandlungserfolg zwischen den evaluierten Kuhtyp-2 und Kuhtyp-3.

Chi Square and Exact Measures of Association

Single Table Analysis Tag 14				Test	Value	p-value(1-tail)	p-value(2-tail)
M-stage Gruppe	Kuhtyp						
	Typ 2	Typ 3					
	pos (M0,3,4)	10	4	14			
	neg (M1,2,4.1)	1	6	7			
	11	10	21				
				Uncorrected chi square	6.109	0.006724	0.01345
				Yates corrected chi square	4.033	0.02231	0.04462
				Mantel-Haenszel chi square	5.818	0.007931	0.01586
				Fisher exact		0.02090	0.04180
				Mid-P exact		0.01096	0.02193
				At least one expected value (row total*column total/grand total) is < 5			
				Fisher or Mid-P exact tests are recommended rather than chi square.			

Abbildung 26: Vierfeldertafel zur Bestimmung des P-Wertes im Kuh-Typ Vergleich der Gruppe C an Tag 14 nach Anwendung des Fisher's Exact Test (P-Wertes $< 0,05$)

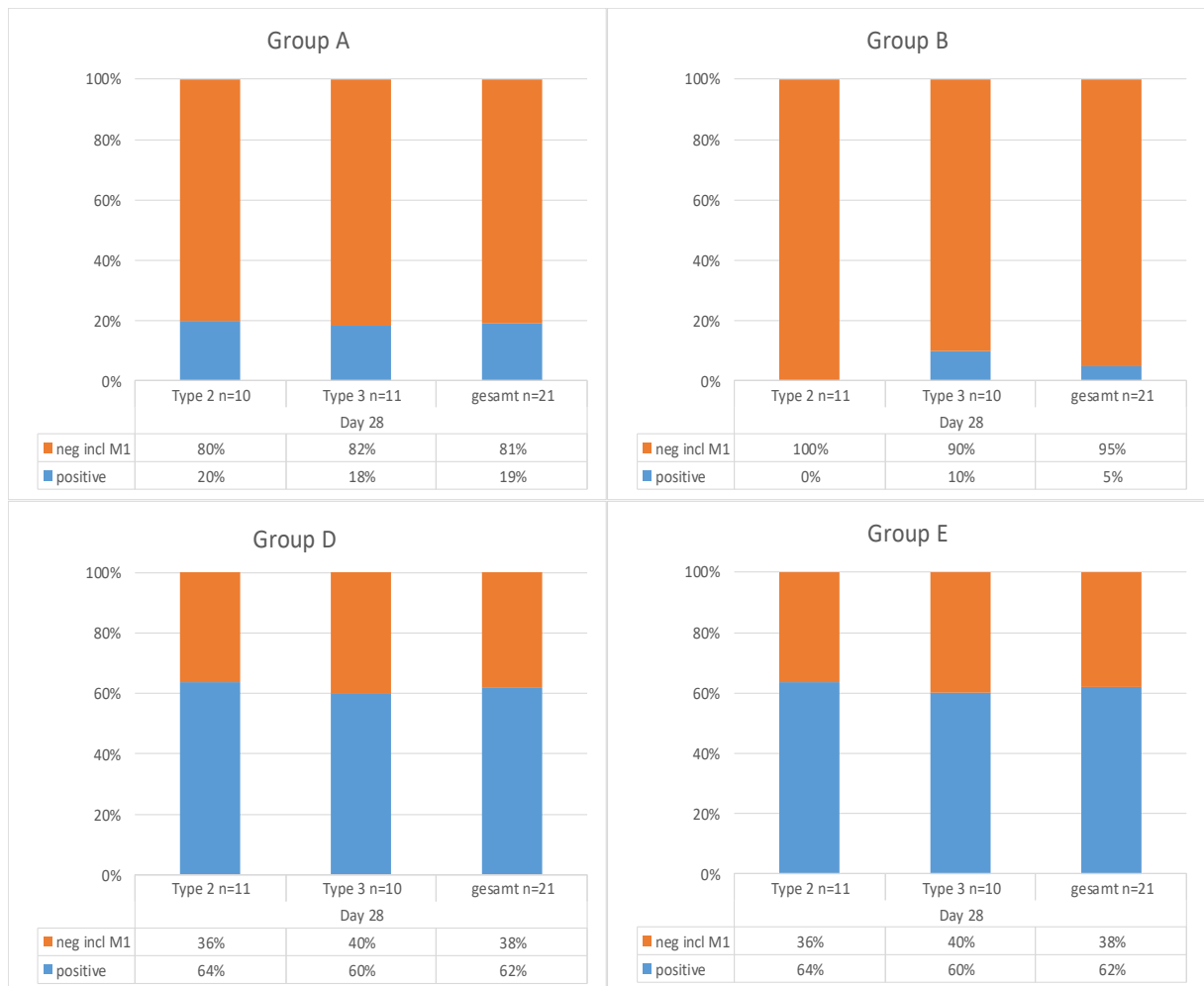


Abbildung 27: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 28 der Gruppen A, B, D, E aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = M0+M3+M4 ; neg incl M1 = M1+M2+M4.1, n= 21 Datenpunkte/Gruppe aus fünf Betrieben

Innerhalb der einzelnen Gruppen zeigt sich auch an Tag 28 kein deutlicher Unterschied des Behandlungserfolgs in der Behandlung einer Typ-2 gegenüber einer Typ-3 Kuh. Das gemeinsame Niveau der Kuh-Gruppen ist innerhalb der Behandlungsgruppe nahezu ausgewogen. Deutliche Unterschiede sind aber in der Gesamtbetrachtung der Gruppen herauszustellen. Während **Gruppe A** weiterhin unter 20% und **Gruppe B** auf 5% im positiven Behandlungsausgang bis Tag 28 abgesunken ist, stehen **Gruppe D** und **E** mit über 60% den beiden anfänglichen Gruppen gegenüber.

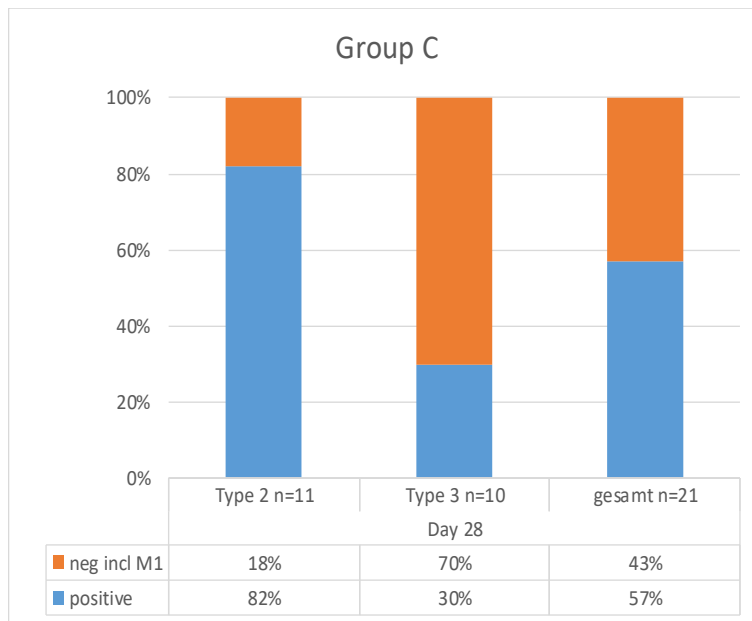


Abbildung 28: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 28 der Gruppe C aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = M0+M3+M4 ; neg incl M1 = M1+M2+M4.1, n= 21 Datenpunkte/Gruppe aus fünf Betrieben

Die **Gruppe C** kann im Gesamtergebnis mit knapp 60% bei Gruppe D und E angesiedelt werden. Im Vergleich der beiden Kuh-Typ-Gruppen zeigt sich ein deutlicher Unterschied von über 50% in dem Ergebnis des positiven Behandlungserfolges. Typ-2 steht mit 82% positiver Entwicklung dem Typ-3 mit lediglich 30% gegenüber.

Zur Überprüfung ob es sich bei diesem Unterschied zwischen dem Resultat der beiden Kuh-Typen um ein statistisch signifikantes Ergebnis handelt, wurde eine Vierfeldertafel berechnet. Da ein Quadrant <5 ist, wurde der Fisher exact Test angewendet. Der p-Value ist <0,05. Somit handelt es sich um einen statistisch signifikanten Unterschied im Behandlungserfolg zwischen den evaluierten Kuhtyp-2 und Kuhtyp-3.

Chi Square and Exact Measures of Association

Single Table Analysis Tag 28			Test	Value	p-value(1-tail)	p-value(2-tail)
M-stage Gruppe	Kuhtyp					
		Typ 2	Typ 3			
	pos (M0,3,4)	9	3	12		
	neg (M1,2,4.1)	2	7	9		
		11	10	21		
				Uncorrected chi square	5.743	0.008276
				Yates corrected chi square	3.822	0.02529
				Mantel-Haenszel chi square	5.47	0.009675
				Fisher exact	0.02417	0.04834
				Mid-P exact	0.01295	0.02589
				At least one expected value (row total*column total/grand total) is < 5		
				Fisher or Mid-P exact tests are recommended rather than chi square.		

Abbildung 29: Vierfeldertafel zur Bestimmung des P-Wertes im Kuh-Typ Vergleich der Gruppe C an Tag 28 nach Anwendung des Fisher's Exact Test (P-Wert < 0,05)

5.1.2 Dunkelfeldmikroskopie

In der Dunkelfeldmikroskopie wurde die Anzahl der innerhalb einer Stunde aus der Biopsie in frisches OTEB ausgewanderten Treponemen bestimmt. Zusätzlich wurde eine mögliche Kontamination aufgenommen sowie die Vitalität der vorliegenden Erreger beurteilt.

Abbildung 30 zeigt beispielhaft wie Treponemen bei 40-facher Vergrößerung in der Dunkelfeldmikroskopie dargestellt wurden. Ihre spiralisierte Form sowie ihr typisches Bewegungsmuster machten es dem Betrachter möglich, diese von Kontaminationen oder kristallinen Anteilen des anaeroben Mediums abzugrenzen. Die Ergebnisse der Dunkelfeldmikroskopie zeigten, dass die Detektion von spiralisierten, beweglichen Bakterien in einem flüssigen Medium möglich ist.

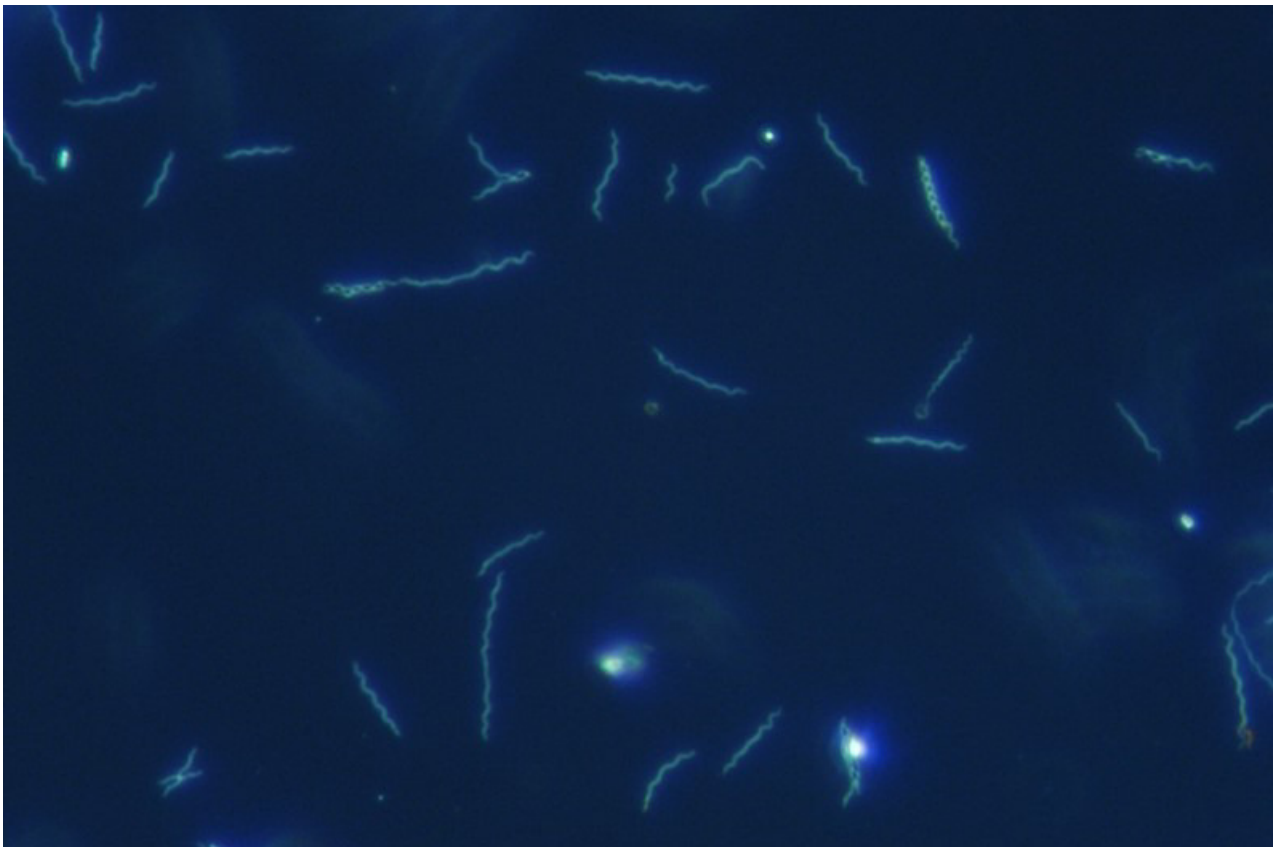


Abbildung 30: spiralisierte Treponemen unter dem Dunkelfeldmikroskop, 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

Für die Möglichkeit der graphischen Darstellung wurde die Anzahl der nachgewiesenen Treponemen kategorisiert. Die Kategorie 0 umfasst alle Proben in denen keine Treponemen in der Dunkelfeldmikroskopie nachweisbar waren. In der Kategorie 1 befinden sich die Proben mit einer sehr geringen nachgewiesenen Anzahl an spiralisierten Treponemen (1-10 Treponemen/10µl). Die Kategorie 2

umfasst die Proben mit einem moderaten bis deutlichen nachgewiesenen Vorkommen spiralisierter Treponemen (11-50 Treponemen/10µl). Alle Proben mit einer nachgewiesenen Anzahl von mehr als 50 spiralisierten Treponemen/10µl wurden der Kategorie 3 (sehr starkes Vorkommen) zugewiesen.

Im zeitlichen Verlauf zeigen alle Gruppen eine Abnahme der nachgewiesenen Anzahl an Treponemen je Biopsie. Zwischen den Gruppen gibt es aber deutliche Unterschiede. Während Gruppe B lediglich eine Reduktion nach antibiotischer Behandlung von 17,1 % zeigt, erreichen Gruppe A (68,2%), C (61,5%), D (54,6%) und E (66,6%) jeweils eine Reduktion der nachgewiesenen Treponemen bis deutlich über 50%. Hierbei erfährt Gruppe A von dem höchsten Ausgangswert der durchschnittlichen Treponemenbelastung die größte Reduktion um 68,2%. Gruppe E hat zum Zeitpunkt der dritten Biopsieentnahme (Tag 28) das niedrigste Level an nachgewiesenen Treponemen erreicht (6 Treponemen/10µl). Bei einer vergleichbaren Ausgangssituation der Gruppen B, C und D (33-39 Treponemen/10µl) ist die erreichte Reduktion der antibiotisch behandelten Gruppe B mit 17% deutlich geringer als die Ergebnisse der nichtantibiotisch behandelten Gruppen C und D mit 62% und 55% erzielter Reduktion.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Gruppe E
Biopsie I	44	35	39	33	18
Biopsie II	23	32	22	20	14
Biopsie III	14	29	15	15	6
Differenz von Tag 0 bis Tag 28	-30	-6	-24	-18	-12
Reduktion der Treponemen in %	68,2	17,1	61,5	54,6	66,6

Abbildung 31: Durchschnittliche Anzahl spiralisierter Treponemen, die an Tag 0, 14 und 28 in den Proben einer Behandlungsgruppe über die Dunkelfeldmikroskopie nachgewiesen wurden; grün zeigt eine positive, rot eine negative Entwicklung an; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

Die graphische Darstellung der Ergebnisse der ermittelten Anzahl an Treponemen in der Dunkelfeldmikroskopie zeigt Abbildung 32. Die Graphik gibt die Anzahl Proben wieder, die bei der jeweiligen Biopsie der Kategorie 0-3 zugeordnet wurden.

Über ein Zusammenfassen des bewerteten Vorkommens der Treponemen pro Behandlungsgruppe und Zeitpunkt (Biopsie I, II oder III) kann die durchschnittliche Belastung der Proben einer Gruppe zum jeweiligen Zeitpunkt dargestellt und im

zeitlichen Verlauf sowohl eine Tendenz innerhalb als auch zwischen den Behandlungsgruppen dargestellt werden.

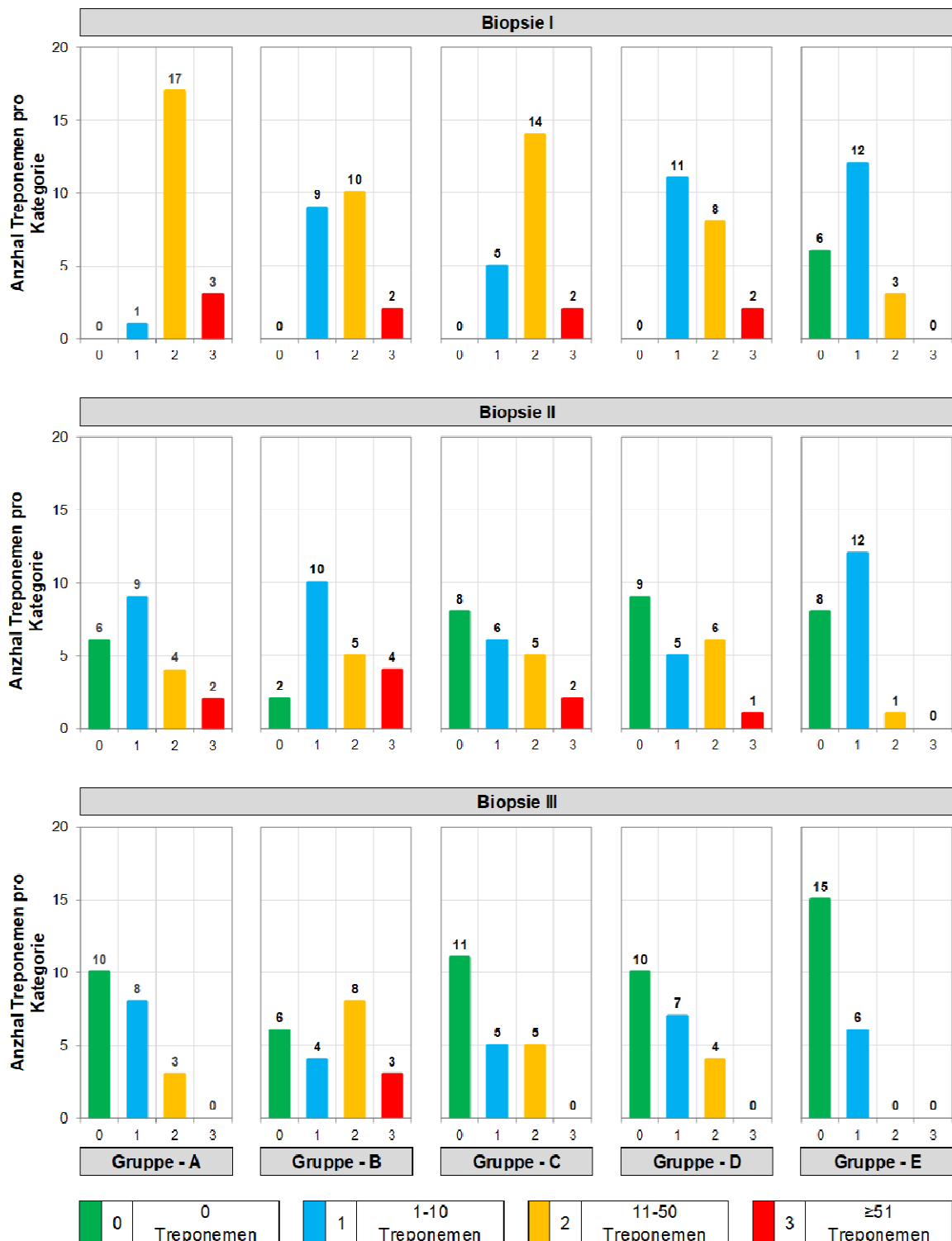


Abbildung 32: Ergebnisse der Treponemenzählung im Gruppenvergleich sowie im zeitlichen Verlauf über die Biopsieentnahmen I-III; Anzahl der Treponemen wurde in 4 Gruppen unterteilt mit 0=keine Treponemen, 1=1-10 Treponemen, 2=11-50 Treponemen und 3=≥50 Treponemen

5.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

In den Aufnahmen des Rasterelektronenmikroskops treten die Treponemen deutlich hervor. Durch ihr gewundenes, äußeres Erscheinungsbild sind sie gut von der Umgebung abzugrenzen. Die Probenaufbereitung aus dem OTEB-Transportmedium der Biopsien ermöglichte die isolierte Abbildung einer Treponeme ohne hochgradige Kontamination des Präparats mit Sekundärkeimen. Bei der Entnahme einer Hautbiopsie werden oft kleine Hautgefäße verletzt. Das schnell koagulierende Blut heftet sich an die entnommene Probe an. Die vorsichtige Reinigung der Biopsie mit einem dünnen Wasserstrahl vor der Überführung in das OTEB, entfernt nicht alle vorhandenen Blutreste. Das Vorliegen einzelner Erythrozyten ist somit nicht ungewöhnlich.



Abbildung 33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des OTEB-Transportmediums; spiralisierte, aus einer Biopsie ausgewanderte Treponeme und der Anschnitt eines Erythrozyten (Stechapfelform) auf der rechten Bildseite

Die Betrachtung der Wundoberfläche mit dem Rasterelektronenmikroskop verdeutlicht die Vielfalt der dort vorherrschenden Bakterien. Neben den gewunden vorliegenden Treponemen sind Kokken und Stäbchen deutlich zu sehen. Das Größenverhältnis der Treponemen zu den Rauigkeiten der Oberfläche der veränderten Haut zeigt deutlich, dass eine Reinigung und Entfernung der Bakterien schwierig ist. Durch die Dreidimensionalität der Aufnahmen sind Treponemen in unterschiedlichen Höhen der Wundoberfläche zu sehen. Neben dem singulären Vorliegen, zeigen die Bilder auch deutlich die beschriebene Neigung der Clusterbildung der Treponemen.

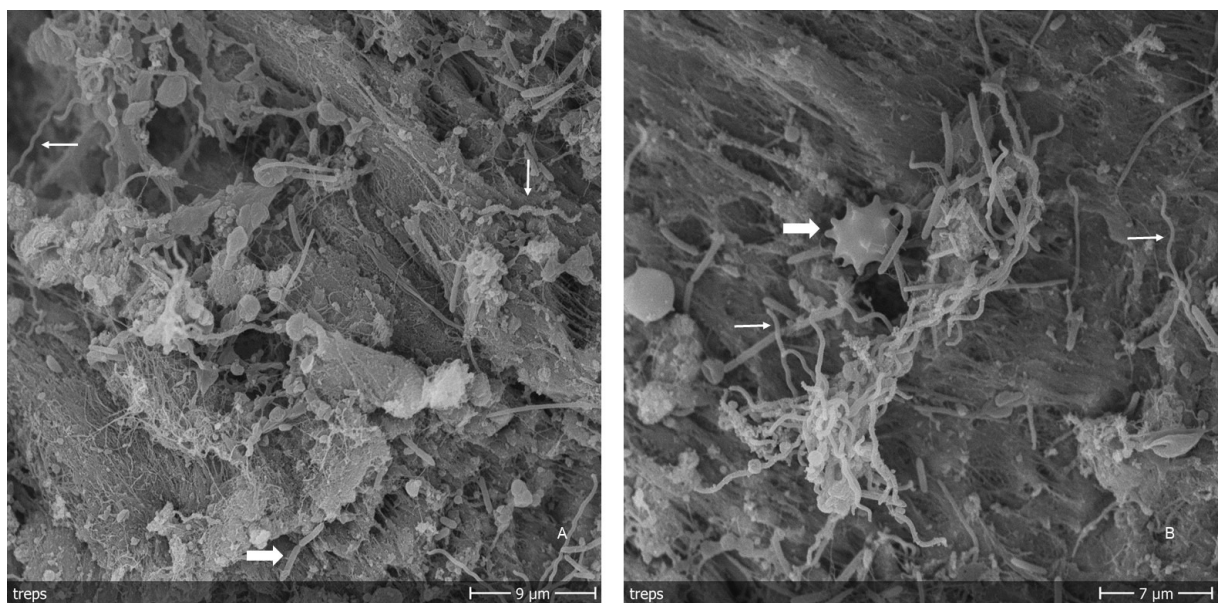


Abbildung 34: Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop; Darstellung der Wundoberfläche einer M2-Läsion nach Biopsieentnahme; A: einzeln vorkommende, spiralisierte Treponemen (dünne, weiße Pfeile) und Stäbchenbakterien (dicker, weißer Pfeil); B: Cluster von Treponemen (dünne, weiße Pfeile) und einem Erythrozyten in Stechapfelform (dicker, weißer Pfeil)

5.1.4 Kombinierte Auswertung der Makroskopie und Mikroskopie

Jede der fünf Behandlungsgruppen hatte mindestens einen für die Behandlungsart repräsentativen positiven sowie negativen Verlauf, der sowohl klinisch als auch histologisch nachzuvollziehen war.

Ein **negativer Verlauf** stellt sich in allen Behandlungsgruppen (A-E) gleich dar. Der M-Score hat sich von Tag 0 (M2) bis Tag 28 zu M1, M2 oder M4.1 entwickelt. Im histologischen Präparat zeigt sich dieser Anteil der erosiven Läsion durch den Verlust des Stratum corneum (Barrier I), einem teilweisen Verlust oder Zusammenhangstrennung des Zellverbands in Barrier II-III.

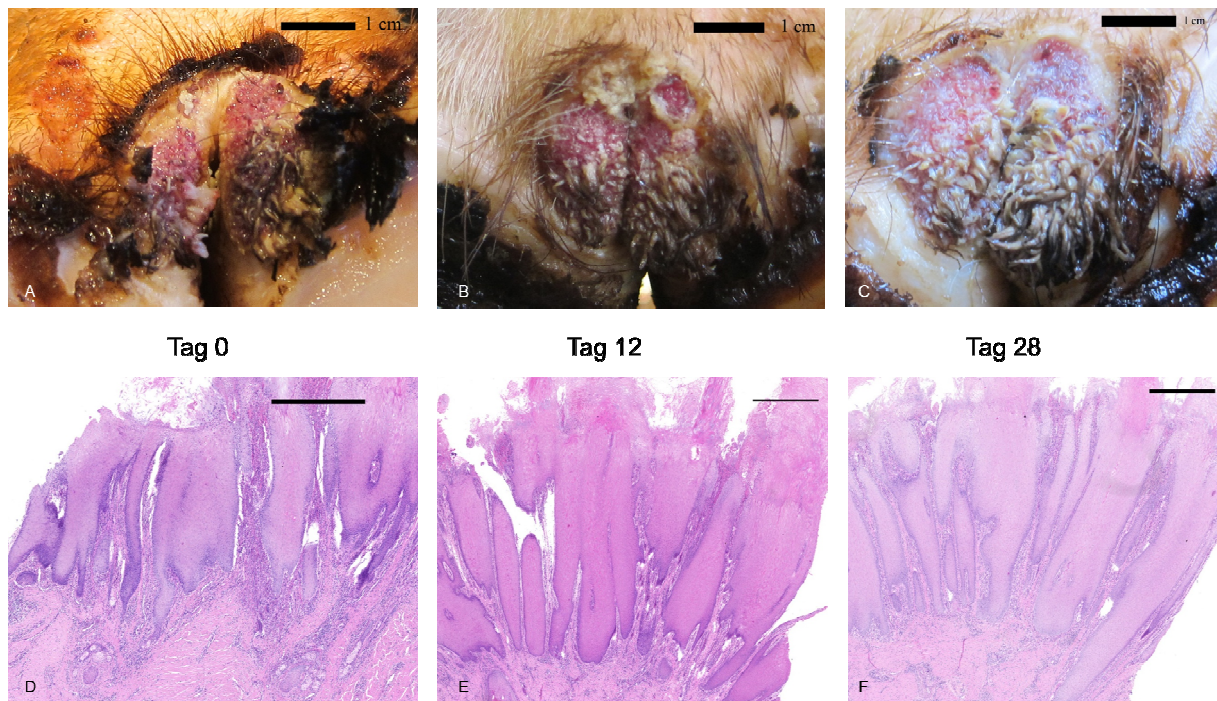


Abbildung 35: negativer Heilungsverlauf von Kuh Nr. 70 (Gruppe B) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 12, 28

Alle **positiven Heilungsverläufe** zeigen einen erfolgreichen, oberflächlichen Verschluss der anfänglichen M2-Läsion an Tag 28. Sowohl klinisch als auch histologisch unterscheiden sich die Arten des primären Wundverschlusses jedoch abhängig von der angewandten Behandlungsmethode.

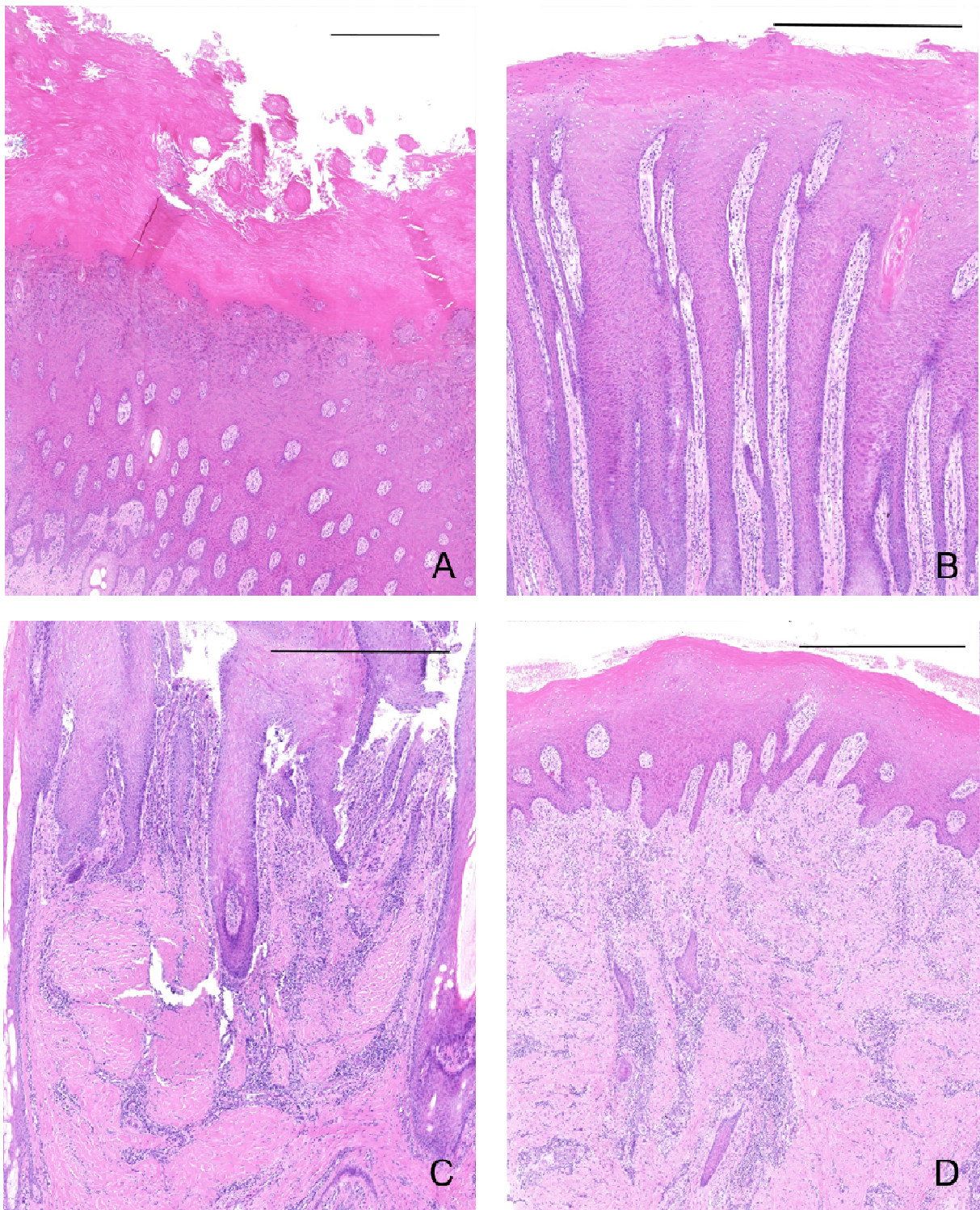


Abbildung 36: Beispielhafte Darstellung einer Hyperkeratose (A) und einer Orthokeratose (B) an Tag 14; Bild C zeigt beispielhaft eine nicht mehr intakte Barrier I-III an Tag 0, Bild D zeigt die Wiederherstellung der Kontinuität des Zellverbandes an Tag 14 von Barrier I-III; der Maßstab entspricht 1 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

In **Gruppe A** zeigt sich klinisch und histologisch ein sehr dünner Wundverschluss. Histologisch erfolgt eine nahezu physiologische Reepithelialisierung des Läsionsbereichs. Allerdings erscheint der Zellverband des *Stratum corneum* wenig belastbar. Die histologische Reorganisation des *Stratum granulosum* und des *Stratum spinosum* ist deutlich mit langem papillären Teil des *Stratum papillare* der *Dermis* verzahnt.

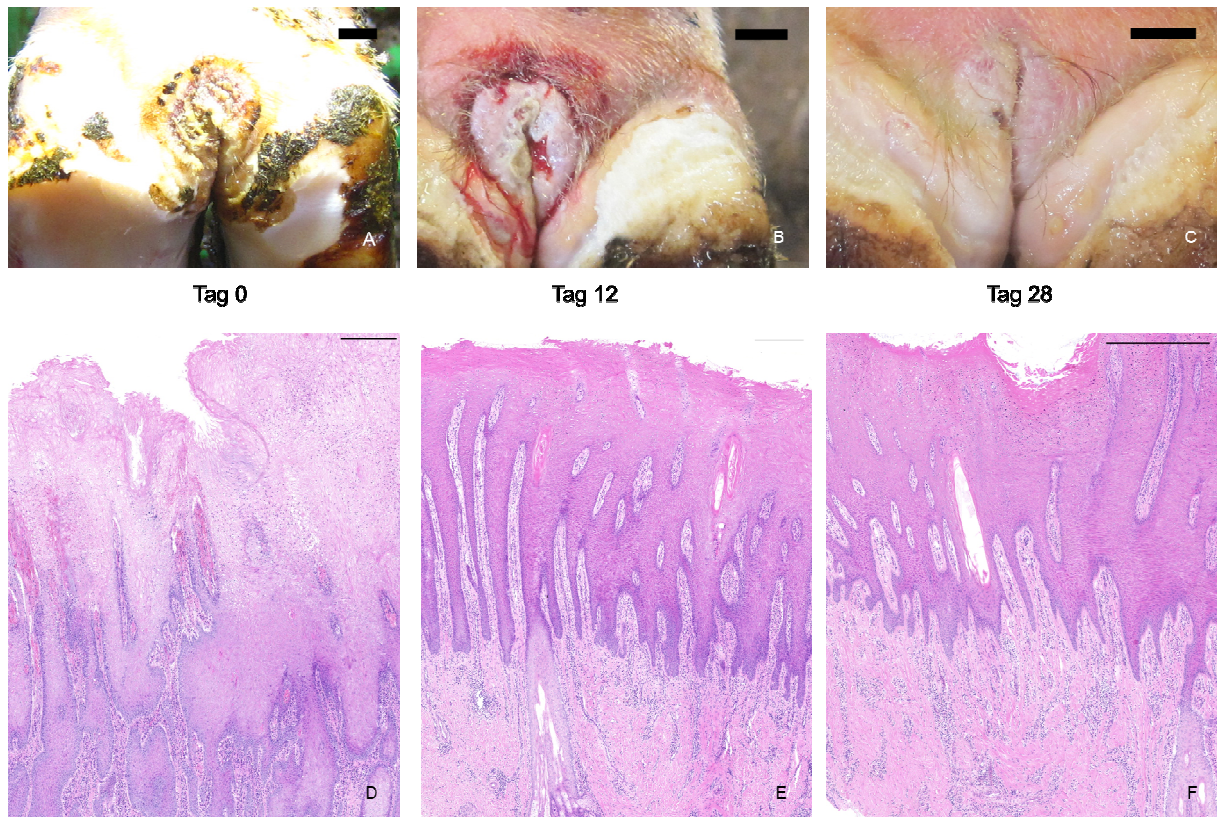


Abbildung 37: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 2 (Gruppe A) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 14, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 0,5 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

Der ehemalige Wundbereich der anfänglichen M2-Läsionen weist nach der Behandlung in **Gruppe B** eine dunkelbraune, harte Kruste auf. Bereits innerhalb der ersten Tage im Anschluss an die Behandlung fällt diese Kruste ab. Zurück bleibt eine meist hyperkeratotische, helle Hautoberfläche. Unter dem Mikroskop stellt sich der Wundverschluss als eine starke Para- und/oder Hyperkeratose des Stratum corneum dar. Eine Restrukturierung des *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* zeigt sich in Gruppe B an Tag 28 bereits im Ansatz. Die Kontinuität der Basalmembran ist wiederhergestellt und die papilläre Schicht der *Dermis* weist erneut Papillen auf.

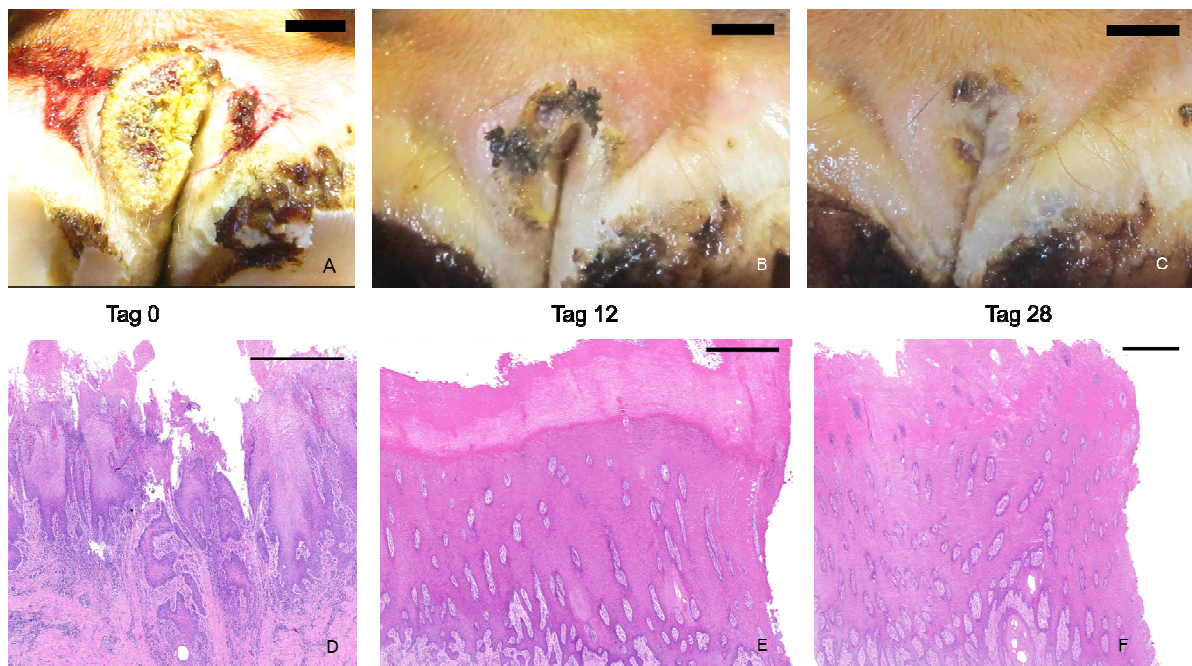


Abbildung 38: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 5 (Gruppe B) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 14, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 1 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

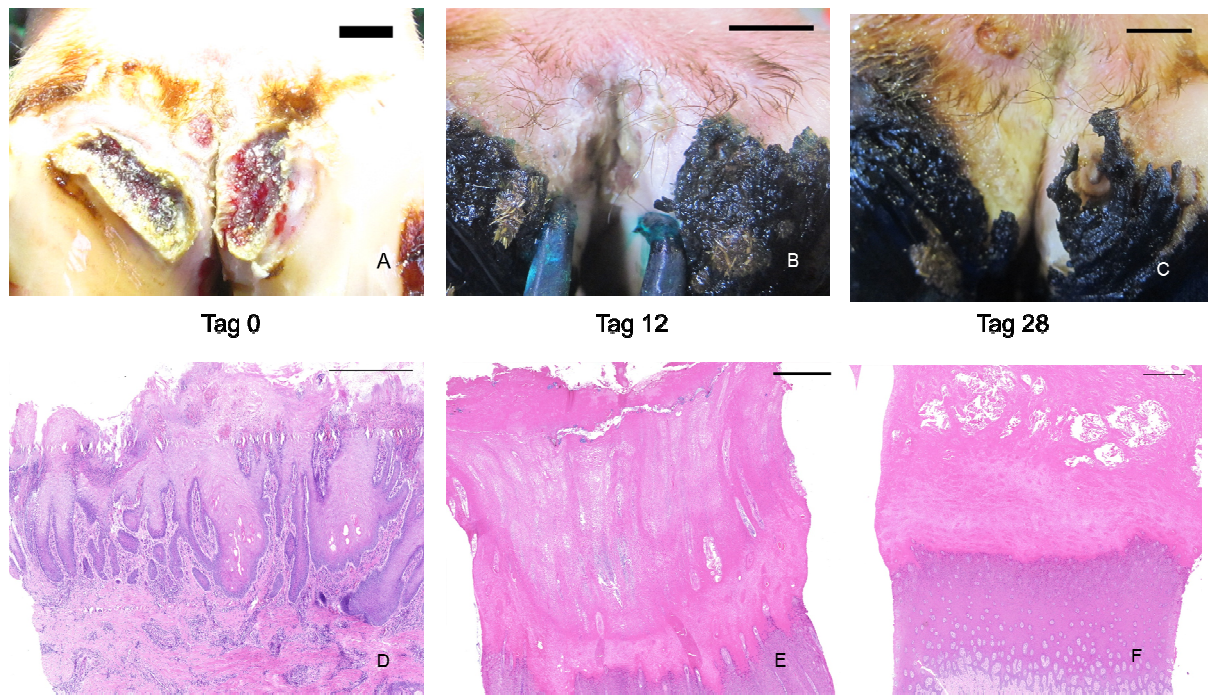


Abbildung 39: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 3 (Gruppe C) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 14, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 1 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

Die klinisch positive Entwicklung der M2-Läsionen nach der Behandlung in **Gruppe C** zeigte sich durch die Bildung einer dunkelbraunen Kruste, die sich im Studienverlauf bis Tag 28 meist ablöste und eine helle Hautoberfläche zurückließ. In der histologischen Betrachtung stellt sich der Wundverschluss als eine starke Para- oder Hyperkeratose dar. Die dunkle Kruste hinterlässt nach dem selbstständigen Ablösen ein ggr. hypertrophes *Stratum corneum*. Die in Gruppe A und E an Tag 28 erfolgte Restrukturierung des *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* zeigt sich in Gruppe C erst im Ansatz und die papilläre Schicht der *Dermis* weist erneut Zotten auf.

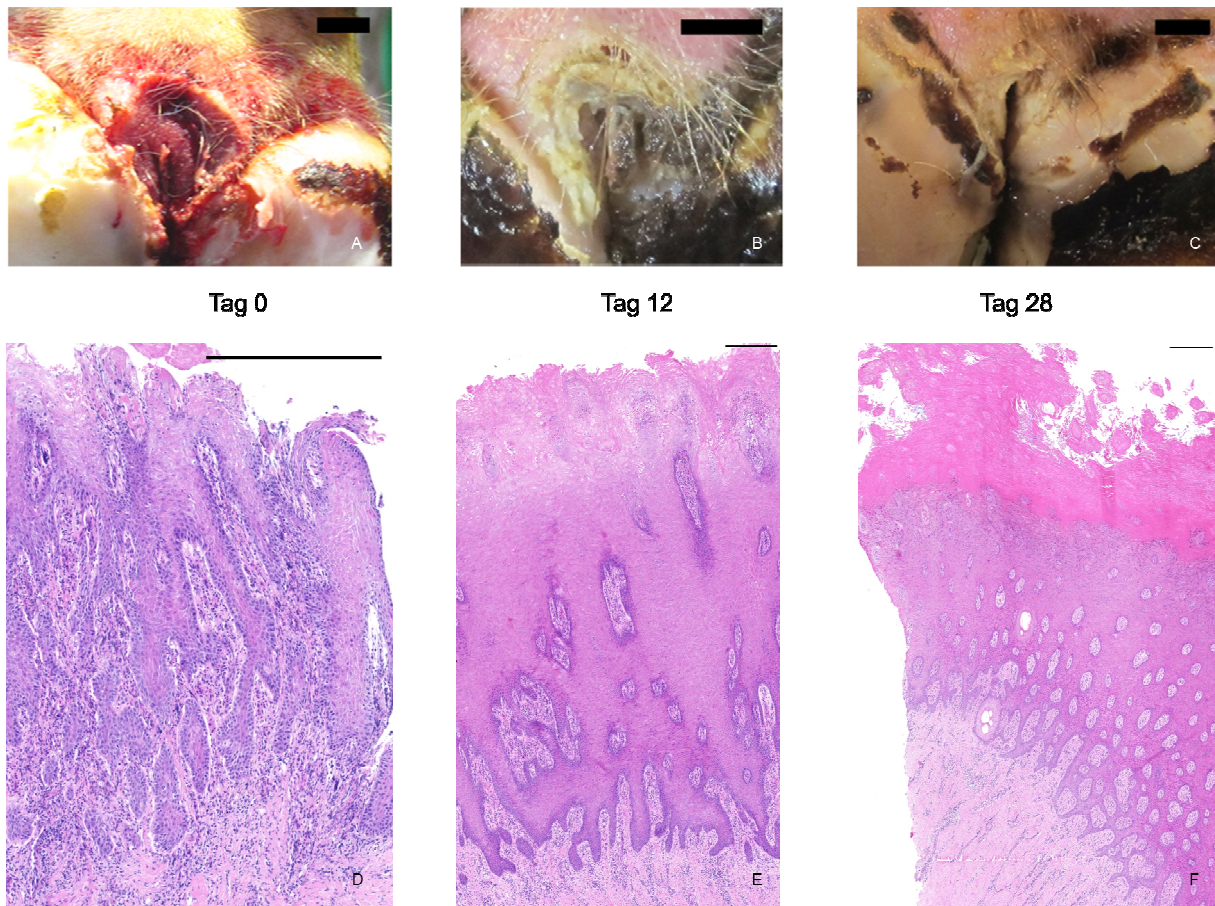


Abbildung 40: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 1 (Gruppe D) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 12, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 0,5 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)

Der klinisch positive Verlauf nach der Behandlung in **Gruppe D** zeigte sich durch einen derben, erhabenen, gelblich bis dunkelbraunen Wundverschluss, der sich im Studienverlauf meist ablöste und eine helle Hautoberfläche zurückließ. Der klinische Eindruck ließ sich in der Histologie gut nachvollziehen. Je nach Zeitpunkt der Biopsieentnahme (Tag 12 oder 28) zeigt sich der Wundverschluss als eine massive Hyperkeratose. Die dicke, derbe hyperkeratotische Schicht, die klinisch erhaben scheint, hinterlässt nach dem Ablösen eine ggr. verdicktes *Stratum corneum*. Die in Gruppe A und E an Tag 28 erfolgte Restrukturierung des Stratum granulosum und *Stratum spinosum* hat in Gruppe D erst begonnen und die papilläre Schicht der *Dermis* weist erneut Zotten auf.

Die positiven Ergebnisse der **Gruppe E** erscheinen denen der Gruppe A vergleichbar. In dem Behandlungszeitraum von 28 Tagen kommt es sowohl zu einem Wundverschluss, einer nahezu physiologischen Reepithelialisierung des Läsionsbereichs sowie zur histologischen Reorganisation des *Stratum granulosum* und des *Stratum spinosum*. Klinisch erscheint das Ballenhorn sowie die Haut des ZKS feucht und aufgequollen. Dies ist auf die Verbandsbehandlung und das Prinzip der feuchten Wundheilung zurück zu führen. Nach Abnahme des Verbands trocknet die Haut in der Umgebungsluft ab.

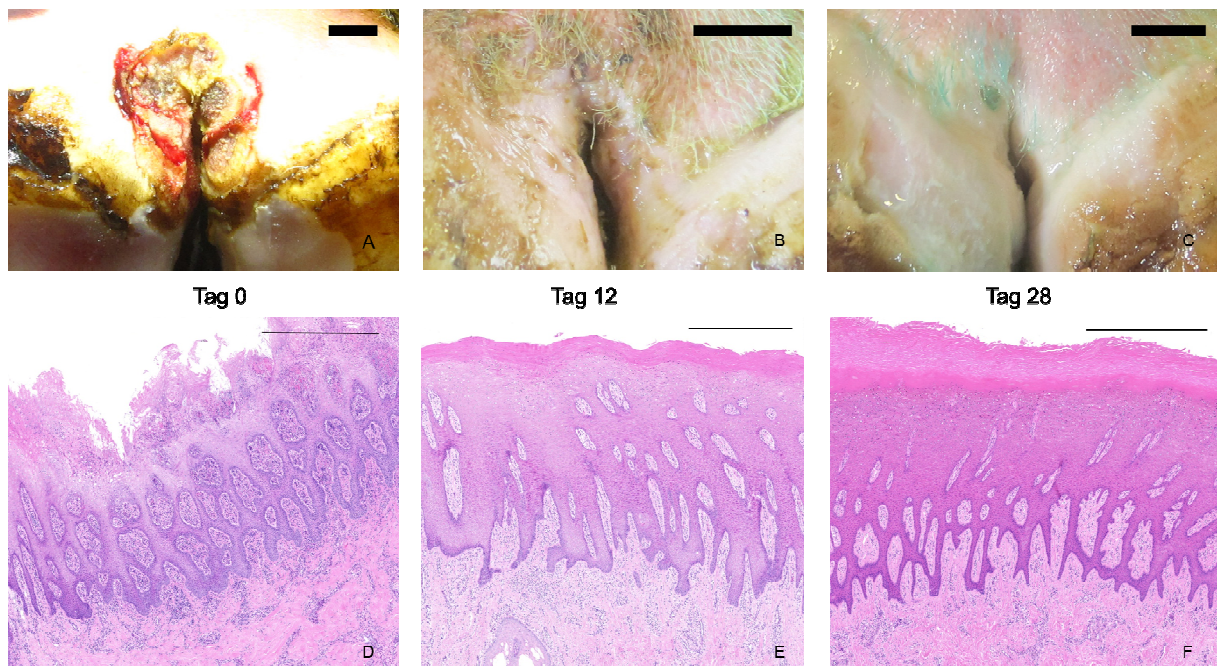


Abbildung 41: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 4 (Gruppe E) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 12, 28

5.1.4.1 Versilberung nach Warthin-Starry

Die Versilberung nach Warthin-Starry ermöglicht die Bewertung im Gewebe vorliegender Treponemen. Da diese Versilberung keine Übersichtsfärbung ist (OT 12), hilft die vergleichende Betrachtung eines HE gefärbten Nachbarschnittes (OT 13). Dies erleichtert die Orientierung im Schnitt und die einwandfreie Abgrenzung der zu bewertenden Barrieren (I-III).

Alle versilberten Präparate der Biopsien I (vor Behandlungsbeginn) wiesen ein unterschiedlich starkes Vorkommen an Treponemen auf. Erst die Präparate der

Biopsien von Tag 14 und 28, die im Anschluss an die unterschiedlichen Behandlungen entnommen wurden, wiesen unterschiedlich starkes Vorkommen sowie voneinander abweichende Eindringtiefen auf.

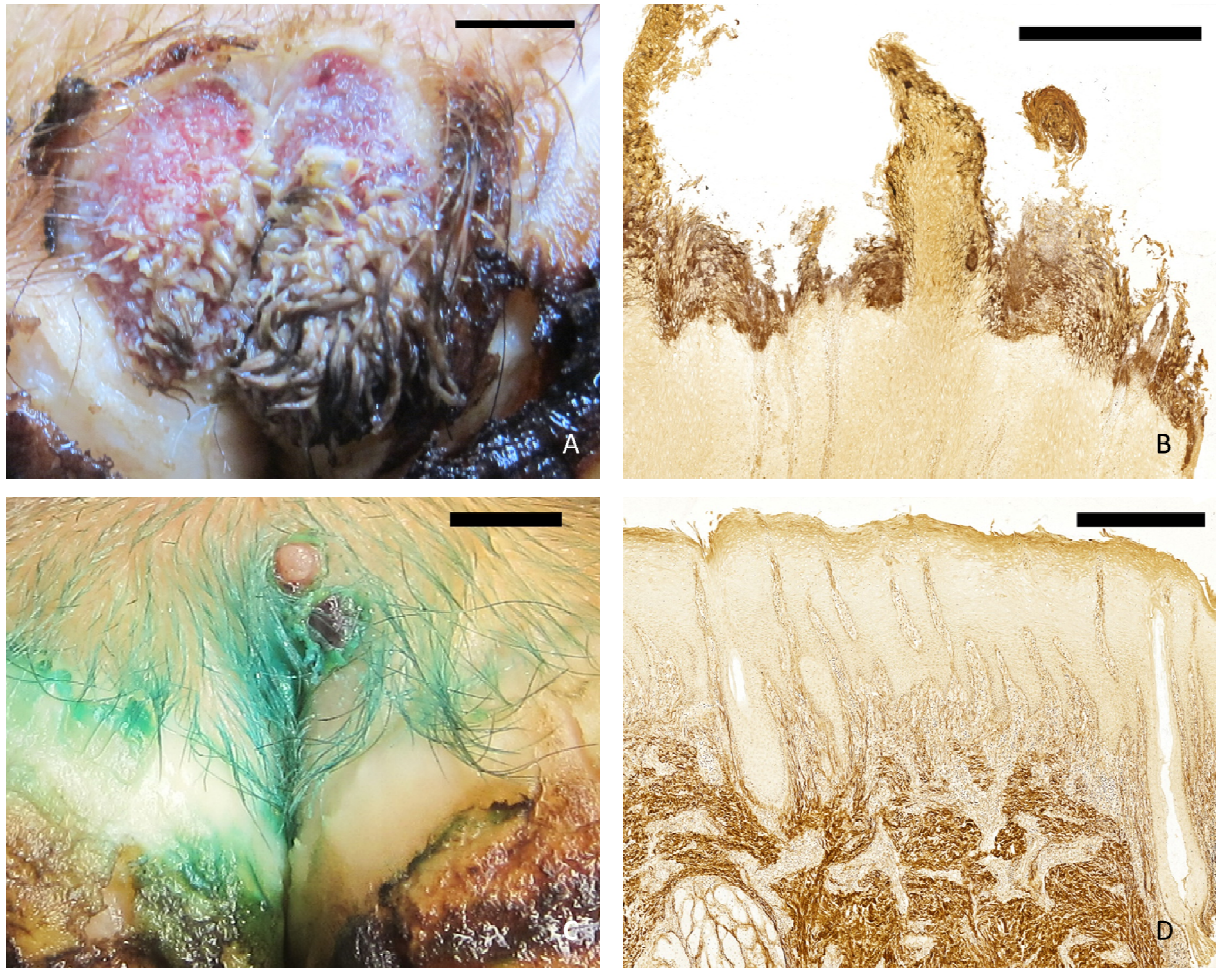


Abbildung 42: Vergleichende Darstellung klinischer M2-Läsion an Tag 28 der Kuh 70 (A) versus M4-Stadium Tag 28 der Kuh 35 (C) sowie Versilberung nach Warthin-Starry an Tag 28 der beiden Kühe. Der angegebene Maßstab in den histologischen Abbildungen entspricht 1 mm (B,D) und 1 cm (A,C)

In Tabelle 12 wird die Eindringtiefe der Treponemen aller Biopate dargestellt. Durch die gemeinsamen Auflistungen der Folgebiopsien kann die Entwicklung sowohl der Eindringtiefe in die einzelnen Gewebeschichten der Haut (Reduktion) als auch eine Elimination der Treponemen im zeitlichen Verlauf dargestellt werden. Zu Versuchsbeginn konnten in allen 105 Biopaten in der histologischen Auswertung der Versilberung nach Warthin Starry Treponemen bis in das *Stratum granulosum* und *Stratum spinosum* befundet werden. An Tag 28 zeigten noch 70% der Proben bis in

diese Tiefe einen Befall mit Treponemen. In 19 Proben konnten keine Treponemen mehr in der histologischen Befundung nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Auswertung der Anzahl vorhandener Treponemen absolut und je Gewebeabschnitt; aufgeteilt nach Biopsieentnahme I,II und III

<u>Biopsie I</u>	Treponemen vorhanden	Treponemen im Str. corneum	Treps. im Str. granulosum + Str. spinosum	Treponemen im Str. basale	Treponemen in der Dermis
ja	105	26	105	102	83
nein	0	0	0	3	22
Str. corneum nicht beurteilbar bei M2-Läsion		79			

<u>Biopsie II</u>	Treponemen vorhanden	Treponemen im Str. corneum	Treps. im Str. granulosum + Str. spinosum	Treponemen im Str. basale	Treponemen in der Dermis
ja	88	52	75	47	33
nein	17	21	30	58	72
Str. corneum nicht beurteilbar bei M2-Läsion		32			

<u>Biopsie III</u>	Treponemen vorhanden	Treponemen im Str. corneum	Treps. im Str. granulosum + Str. spinosum	Treponemen im Str. basale	Treponemen in der Dermis
ja	86	45	74	47	33
nein	19	22	31	58	72
Str. corneum nicht beurteilbar bei M2-Läsion		38			

Im Anschluss an die Gesamtübersicht aller Bioptate von Tag 0, 14 und 28 folgt in Tabelle 13 eine weitere Aufgliederung der Ergebnisse hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Proben, die in der histologischen Bewertung als frei von Treponemen eingestuft wurden. Zusätzlich zu den Gruppendarstellungen wird auch die Unterteilung der jeweiligen Behandlungsgruppe in die zwei Kuh-Typen (Kuh Typ-2 und Kuh Typ-3) realisiert.

Während das Ergebnis der Gruppe B keine Proben beinhaltet, die frei von Treponemen sind, weisen Gruppe A, C, D und E jeweils eine unterschiedlich starke Elimination an Treponemen aus 2-7 Proben von 21 Proben je Gruppe auf. Während die Verteilung der erregerefreien Proben in Gruppe D auf beide Kuh-Typen gleichmäßig ausfällt, zeigen Gruppen C und E einen deutlichen Schwerpunkt in der Erregerefreiheit der Proben der Kuh Typen 2. Die von Erreger freien Proben der Gruppe A sind auf die Kühe des Typ 3 beschränkt.

Tabelle 13: Anzahl der Tiere pro Behandlungsgruppe und Kuh-Typ, bei denen in der dritten Biopsie (Tag 28) keine Treponemen in der Versilberung nach Warthin-Starry mehr nachweisbar waren

Biopsie III Behandlungsgruppe (n=21)	Bioptate frei von Treponemen	Kuh Typ-2	Kuh Typ-3
Gruppe A	2/21	0/10	2/11
Gruppe B	0/21	0/11	0/10
Gruppe C	7/21	6/11	1/10
Gruppe D	4/21	2/11	2/10
Gruppe E	7/21	6/11	1/10

5.1.4.2 Univariate Analyse

Für einen ersten Überblick über den vorliegenden Datensatz wurde die Univariate Analyse einiger Parameter durchgeführt.

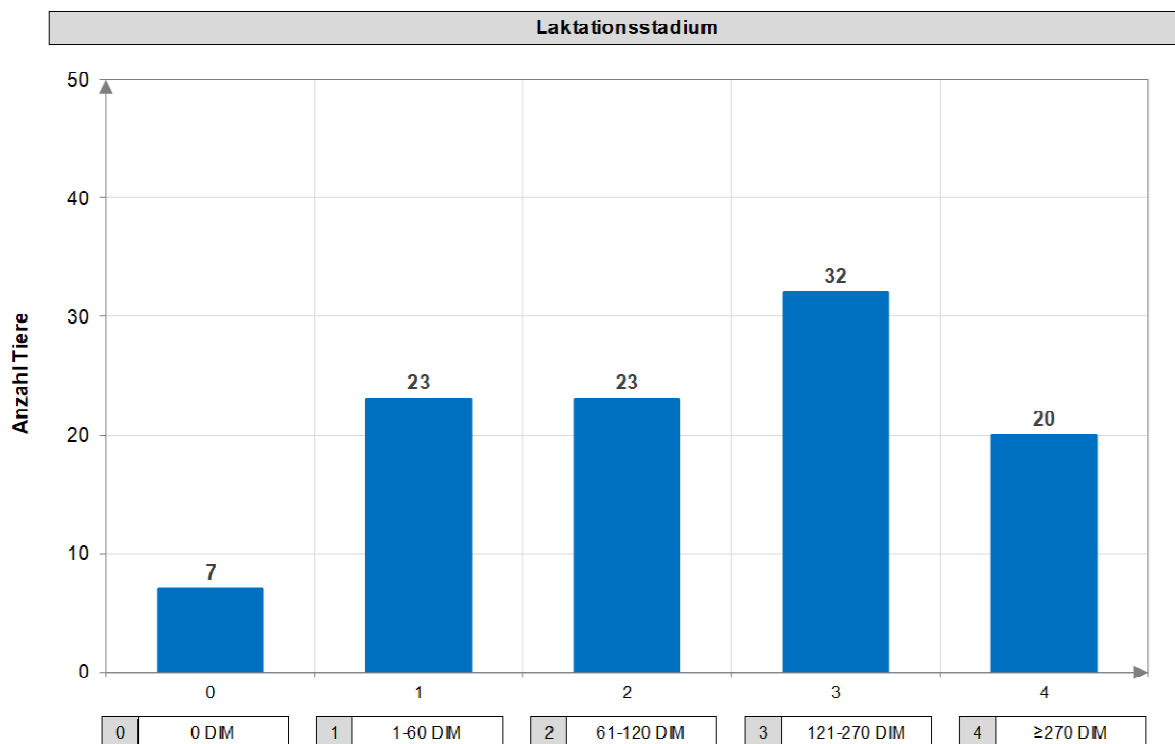


Abbildung 43: Histogramm DIM aller Versuchstiere mit 1=0-60 DIM, 2=61-120 DIM, 3=121-270 DIM, 4≥271 DIM

Für die Betrachtung der Anzahl der Tage in Milch (DIM) der einzelnen Kühe wurde diese Variable zuerst in Frischlaktierende (0-60), Hochlaktierende (61-120),

Spätlaktierende (121-270) und Altmelkende (≥ 271) gruppiert. Es zeigt sich in Abbildung 43 eine gleichmäßige Verteilung der Studientiere auf alle vier Gruppen.

In der Abbildung 44 findet sich die jeweilige Anzahl der Studientiere pro Laktationsgruppe. Der deutlich größere Anteil an Erstlaktierenden gegenüber den Tieren in höheren Laktationen spiegelt eine vorherrschende Verteilung in einer Milchviehherde wieder. Um diesem Ungleichgewicht gerecht zu werden, wurde die Einteilung in Erstlaktierende (Laktation=1) und höher (Laktation ≥ 2) vorgenommen.

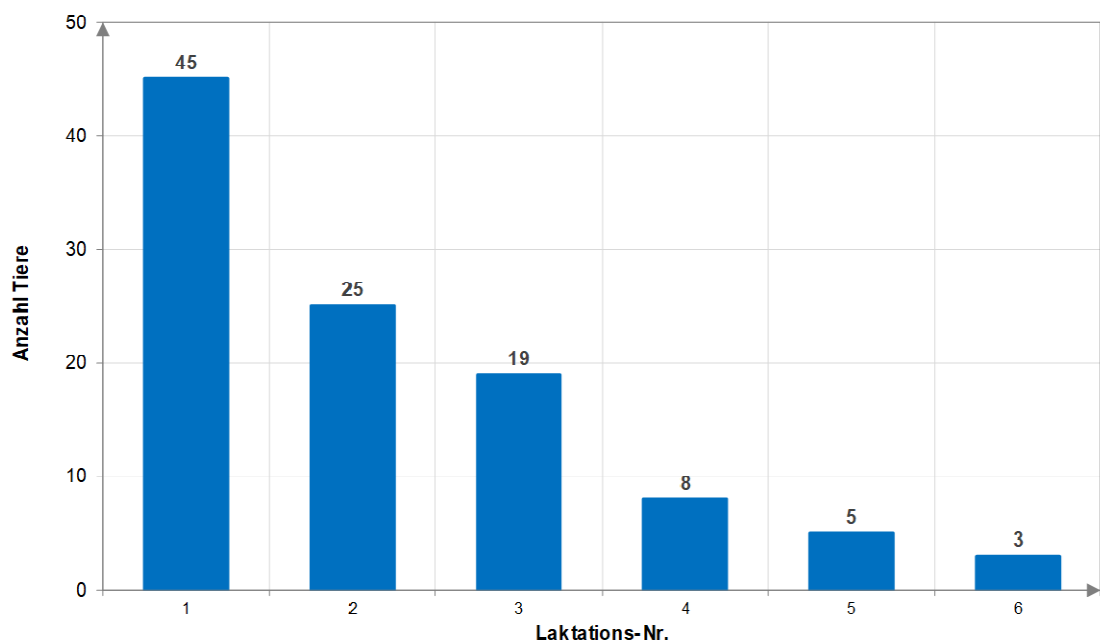


Abbildung 44: Histogramm zur Darstellung der Verteilung der Anzahl der Abkalbungen je Studientier

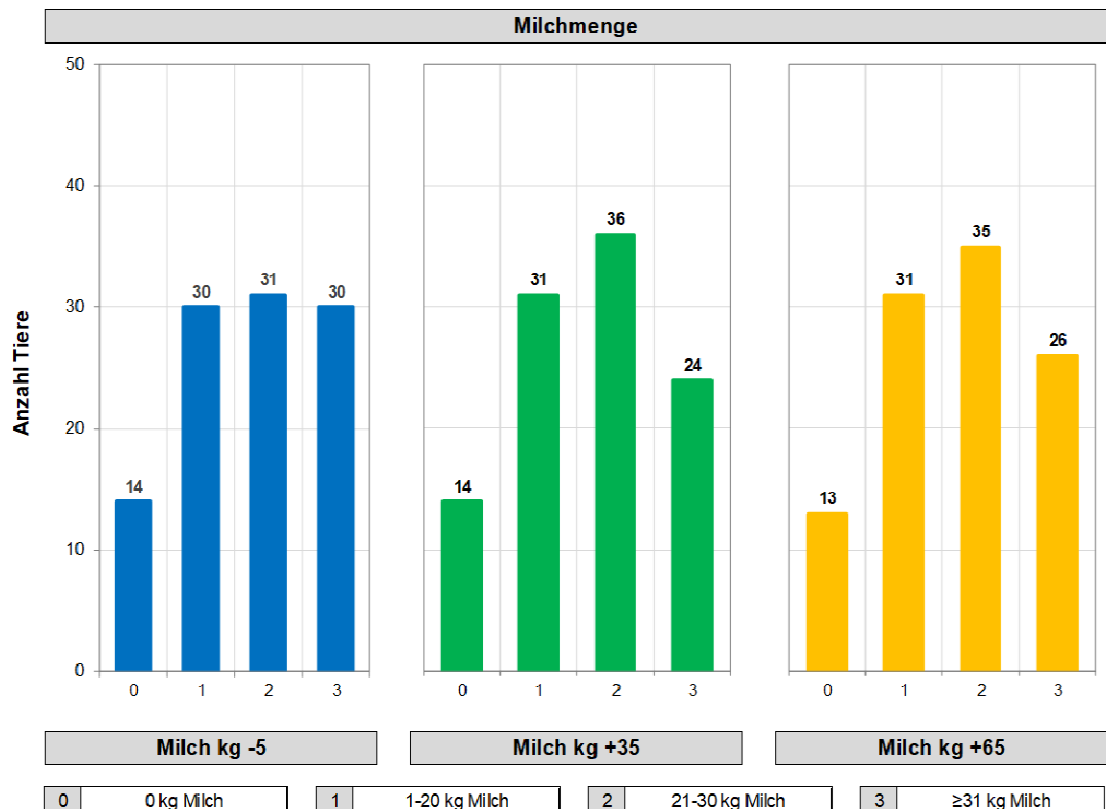


Abbildung 45: Histogramme zur Verteilung der Milchleistung der Studentiere an Tag -5, 35, 65

In Abbildung 45 wird die Milchleistung der Studienherde abgebildet. Ein gleichmäßiger Anteil von 11-13 Tieren steht zu der jeweiligen Erfassung trocken oder ist bisher noch nicht in die erste Laktation gekommen. Lässt man diese Tiere aus der Milchmengenbetrachtung heraus, so ergibt sich eine durchschnittliche Milchleistung der Studentiere an Tag -5 von 27,3 Liter/Tag (10-50 Liter/Tag), an Tag 35 von 26,3 Liter/Tag (9-49 Liter/Tag) und an Tag 65 von 26,2 Liter/Tag (10-50 Liter/Tag).

5.1.4.3 Multivariate Analyse

Tabelle 14: Auflistung und Beschreibung der korrelierenden oder statistisch signifikanten Variablen aus der multivariaten Analyse

<u>Variable</u>	<u>Biopsie-Nr.</u>	<u>Untersuchung</u>	<u>Bedeutung</u>	<u>mögliche Ergebnisse</u>
Group			Behandlungsgruppe	
Group2			die jeweils betrachtete Behandlungsgruppe + Gruppe B (CTC-Spray)	
He1_inflamn	1	Hämalaun-Eosin-Färbung	Entzündung	0=akut 1=chronisch
HE2_Bar1intn	2	Hämalaun-Eosin-Färbung	Barriere 1 intakt	0=nein 1=ja
HE2_Bar3intn	2	Hämalaun-Eosin-Färbung	Barriere 3 intakt	0=nein 1=ja
He3_Bar1even	3	Hämalaun-Eosin-Färbung	Barriere 1 eben	0=nein 1=ja
HE3_Bar1physion	3	Hämalaun-Eosin-Färbung	Barriere 1 physiologisch	0=nein 1=ja
He3_Bar3int	3	Hämalaun-Eosin-Färbung	Barriere 3 intakt	0=nein 1=ja
He3_perivas	3	Hämalaun-Eosin-Färbung	perivakuläre Infiltration	0=nein 1=ja
WSsp1_SCn	1	Warthin-Starry-Versilberung	spiralisierte Treponemen im Stratum corneum	0=nein 1=ja
WSsp1_papiderm	1	Warthin-Starry-Versilberung	spiralisierte Treponemen in der papillären Dermis	0=nein 1=ja
WSsp3_SGSSP	3	Warthin-Starry-Versilberung	spiralisierte Treponemen im Stratum granulosum+Stratum spinosum	0=nein 1=ja
WSsp3_SBn	3	Warthin-Starry-Versilberung	spiralisierte Treponemen im Stratum granulosum+Stratum spinosum	0=nein 1=ja
WSsp3_papidermn	3	Warthin-Starry-Versilberung	spiralisierte Treponemen in der papillären Dermis	0=nein 1=ja
WSen3_SB	3	Warthin-Starry-Versilberung	enzystierte Treponemen bis zum Stratum basale	0=nein 1=ja
WSen3_papiderm	3	Warthin-Starry-Versilberung	enzystierte Treponemen in der papillären Dermis	0=nein 1=ja
B3Treps	3	Dunkelfeldmikroskopie	Anzahl der Treponemen ≥ 1	0=nein 1=ja
B2Score	2	DD Check App	M-Stadium	0=M2 1=andere
B3Score	3	DD Check App	M-Stadium	0=M2 1=andere
B1chron	1	DD Check App	Chronizität der DD-Läsion	0=hyperkeratotisch 1=proliferativ
B2chron	2	DD Check App	Chronizität der DD-Läsion	0=hyperkeratotisch 1=proliferativ
B3chron	3	DD Check App	Chronizität der DD-Läsion	0=hyperkeratotisch 1=proliferativ
Breed			Rasse	0=HF 1=andere
Typ			Kuh-Typ	0=2 1=3
DIM			Days In Milk	0=<60 Tage 1= ≥ 61 Tage
Laktation			Laktation	0=1.Laktation 1= ≥ 2 .Laktation
Milk35			Milchleistung an Tag 35 nach Studienbeginn	0=<30 Liter 1= ≥ 31 Liter
Milk65			Milchleistung an Tag 65 nach Studienbeginn	0=<30 Liter 1= ≥ 31 Liter

5.1.4.3.1 Bayesian Network

Im Bayesian Network wurde immer eine der Behandlungsgruppen (A, C, D oder E) mit der Gruppe B gemeinsam analysiert. Aus dieser Bearbeitung sind somit vier Bayesian Networks entstanden. Das Bayesian Network dient dazu, enge Verbindungen der zu untersuchenden Parameter zur Variable Group (Behandlungsgruppe) herauszustellen. Herausgesucht wurden vorerst in einer bestehenden Verbindung die folgenden zwei Knotenpunkte in alle Richtungen, um diese später in die logistische Regression mit einfließen lassen zu können.

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils Ausschnitte der Netzwerke. Die vollständigen Netzwerke der Gruppenvergleiche befinden sich der Vollständigkeit halber im Anhang.

In dem Bayesian Netzwerk AB der Gruppen A versus B waren folgende Parameter direkt und indirekt mit der Variable Group verbunden:

- WSsp3_papiderm
- WSsp3_SB
- WSen3_papiderm
- He3_Bar3int
- B3Trep3

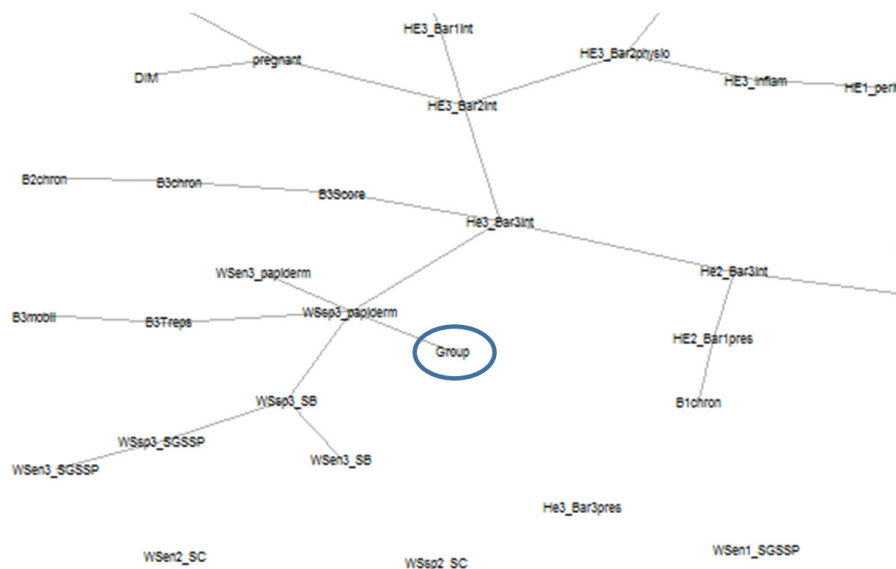


Abbildung 46: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot A vs B from dd7ABx.RData, n=42

In dem Bayesian Netzwerk CB der Gruppen C versus B waren folgende Parameter direkt und indirekt mit der Variable Group verbunden:

- WSp3_SGSSP
- WSp3_SB
- WSen3_SB
- Typ

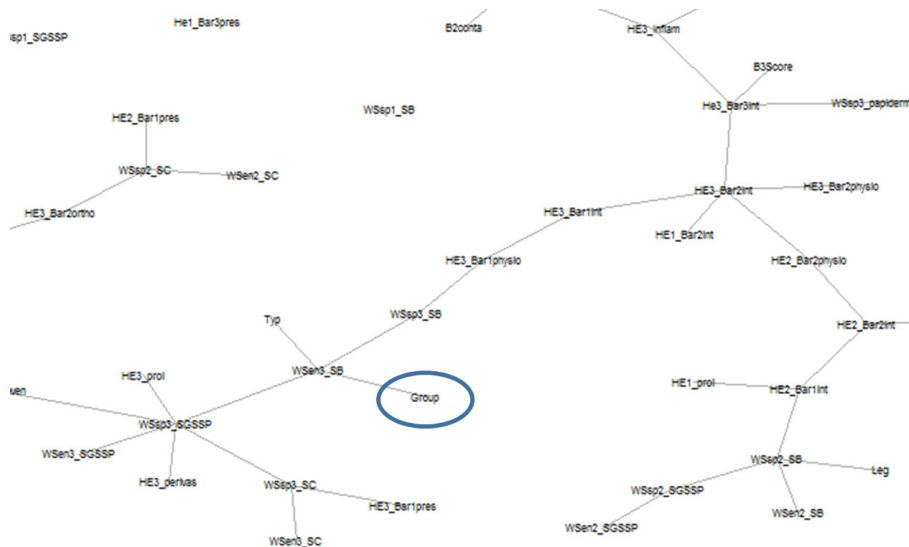


Abbildung 47: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot C vs B from dd7CBx.RData, n=42

In dem Bayesian Netzwerk DB der Gruppen D versus B waren folgende Parameter direkt und indirekt mit der Variable Group verbunden:

- He1_inflam
- WSsp3_SB
- WSsp1_papiderm
- WSsp3_SGSSP
- WSen3_SB
- He3_Bar1even

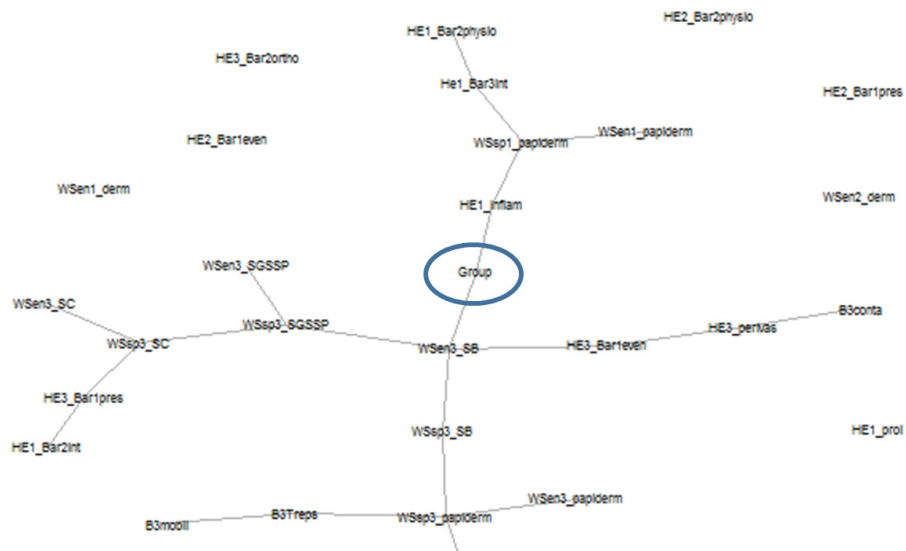


Abbildung 48: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot D vs B from dd7DBx.RData, n=42

In dem Bayesian Netzwerk EB der Gruppen E versus B waren folgende Parameter direkt und indirekt mit der Variable Group verbunden:

- B2chron
- B3chron
- WSp3_SGSSP
- WSen3_SB
- He3_pervas
- Breed

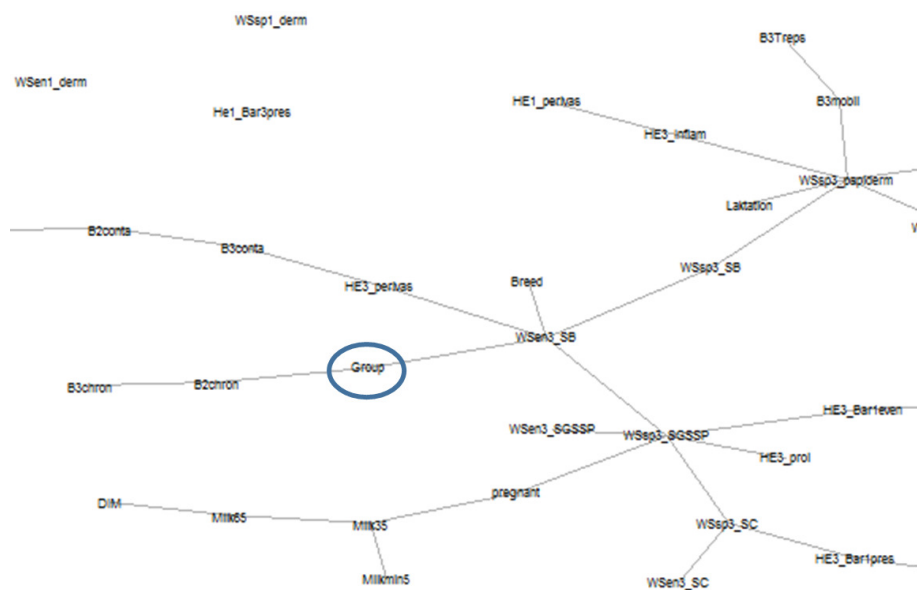


Abbildung 49: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot E vs B from dd7EBx.RData, n=42

5.1.4.3.2 Logistische Regression

Die Ergebnisse der 4 logistischen Regressionen mit der binären Zielvariable Behandlungsgruppe B versus A, C, D oder E ergaben nach schrittweiser Elimination nicht relevanter Parameter (p -Wert $\geq 0,05$) diejenigen Erfolgsdefinitionen, die sich im Gruppenvergleich statistisch signifikant voneinander unterscheiden. In Abbildung 50 bis Abbildung 53 sind die Odds Ratio der Erfolgsdefinitionen der einzelnen Modelle graphisch dargestellt. Einige kuhassoziierte Variablen („DIM“, „Laktation“, „pregnant“) wurden in das Modell der logistischen Regression zur Vermeidung von „Confounding“ Effekten hineingezwungen. Die Variablen „Nr“ als Korrektur für den Zeitfaktor und „farm“ zur Korrektur für die unterschiedliche Anzahl der Tiere je Studienbetrieb wurde ebenfalls mit aufgenommen.

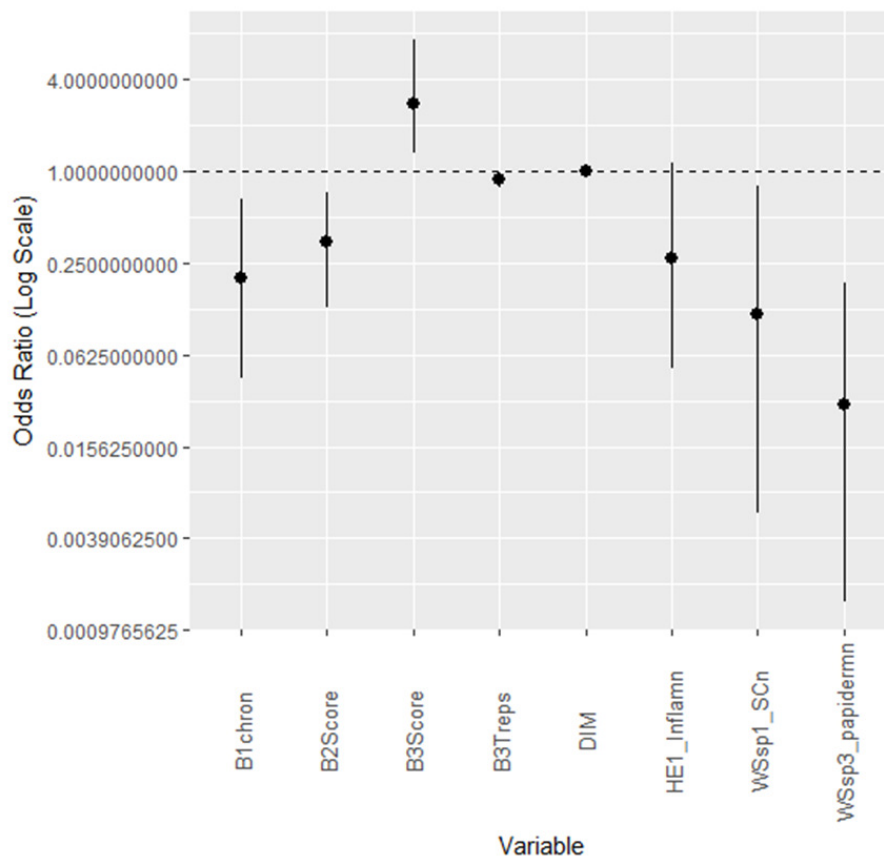


Abbildung 50: Graphische Darstellung der Adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe A gegen Gruppe B

Die Abbildung 50 illustriert die Odds Ratio für die Häufigkeit der Zugehörigkeit zu **Gruppe A** verglichen mit **Gruppe B**.

Bei der makroskopischen Läsionsbeurteilung war an Tag 0, 14 und 28 jeweils ein Parameter relevant. An Tag 0 war ein Tier mit einer proliferativen DD-Läsion 5-mal wahrscheinlicher in Gruppe B, als Tiere mit einer nicht-chronischen oder hyperkeratotischen Läsion. Somit unterschied sich die Gruppenzusammensetzung vor Behandlungsbeginn hinsichtlich der beurteilten Chronizität statistisch signifikant. Die dichotomisierten M-Stadien (1 = chronische Läsion (M4+M4.1) und 0 = M2) unterschieden sich statistisch signifikant aber gegensätzlich an den Tagen 14 und 28. Hatte eine Kuh an Tag 14 („B2Score“) eine chronische Läsion, war sie 5-mal häufiger in Gruppe B als in A. Hatte sie an Tag 28 eine chronische Läsion („B3Score“) war sie 3-mal häufiger in Gruppe A als in Gruppe B.

Bei der histologischen Läsionsbeurteilung zeigte sich wieder statistisch signifikant eine inhomogene Gruppenzusammensetzung: An Tag 0 waren Tiere mit chronischen Entzündungszeichen im HE-Präparat („HE1_Inflamn“) 4-mal wahrscheinlicher in Gruppe B als Tiere mit akuten Entzündungszeichen. Zudem waren Tiere mit spiralisierten Treponemen im Stratum corneum des versilberten Präparats sogar 20-mal wahrscheinlicher in Gruppe B als in Gruppe A. „WSsp3_papiderm“ gibt das Vorkommen spiralisierter Treponemen an Tag 28 bis in die papilläre Dermis wieder. Kamen in der dritten Biopsie spiralisierte Treponemen in dieser Schicht vor, war ein Tier 80-mal wahrscheinlicher in Gruppe B als in Gruppe A. In der gemeinsamen Betrachtung von makroskopischer und histologischer Läsionsbeurteilung wird also ein Unterschied zwischen einer nicht antibiotischen (Gruppe A) und einer antibiotischen Behandlungsgruppe (Gruppe B) deutlich.

Die Anzahl der Treponemen an Tag 28 in der Dunkelfeldmikroskopie („B3Treds“) sowie „DIM“ waren in den beiden Gruppen gleichmäßig vertreten.

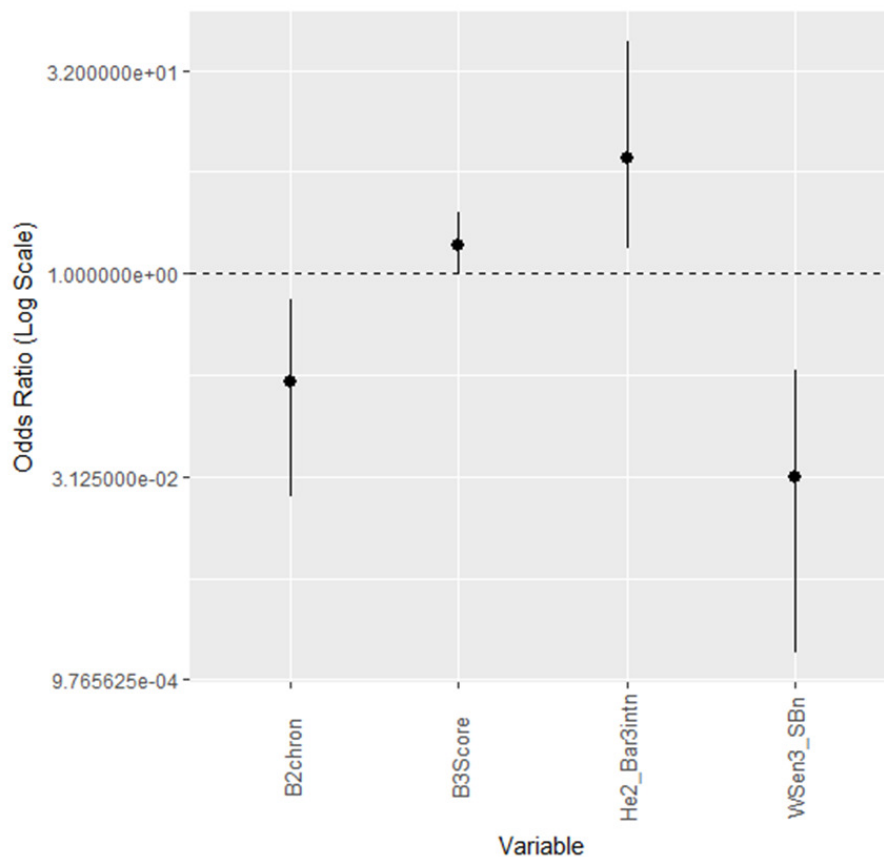


Abbildung 51: Graphische Darstellung der Adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe C gegen Gruppe B

In der Abbildung 51 illustriert die Odds Ratio die Häufigkeit der Zugehörigkeit zu **Gruppe C** verglichen mit **Gruppe B**. Bei der makroskopischen Läsionsbeurteilung war an Tag 14 und 28 jeweils ein Parameter relevant. An Tag 14 war ein Tier mit einer proliferativen DD-Läsion 2-mal wahrscheinlicher in Gruppe B, als Tiere mit einer nicht-chronischen oder hyperkeratotischen Läsion („B2chron“). Die dichotomisierten M-Stadien (1 = chronische Läsion (M4+M4.1) und 0 = M2) unterschieden sich statistisch signifikant an Tag 28. Hatte eine Kuh an Tag 28 („B3Score“) eine chronische Läsion, war sie 0,4 mal häufiger in Gruppe C als in B. Bei der histologischen Läsionsbeurteilung zeigten sich erneut statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen B und C. An Tag 14 waren Tiere mit einer im HE-Präparat intakten Barrier III 1,7-mal wahrscheinlicher der Gruppe C angehörig, als Tiere ohne intakte Barrier III („He2_Bar3intn“). Zum Zeitpunkt der dritten Biopsieentnahme (Tag 28) gehörten die Tiere mit in der Versilberung nachgewiesenen, enzystierten Treponemen bis zum *Stratum basale* 30-mal wahrscheinlicher der Gruppe B an.

Es zeigt sich, dass die Tiere der Gruppe B bei der zweiten Biopsieentnahme mehr proliferative Läsionen aufweisen, als die der Gruppe C („B2chron“). Am Ende der Studienzeit wiesen die Tiere der Gruppe C mehr chronische Läsionen als M2-Läsionen auf („B3Score“). Schon an Tag 14 zeichnete sich ab, dass die Tiere mit einer histologisch intakten Barrier III der Gruppe C angehören („He2_Bar3intn“). Zum Zeitpunkt der dritten Biopsieentnahme gehörten die Tiere mit histologisch nachgewiesenen, enzystierten Treponemen bis zum Stratum basale der Gruppe B an („WSen3_SBn“).

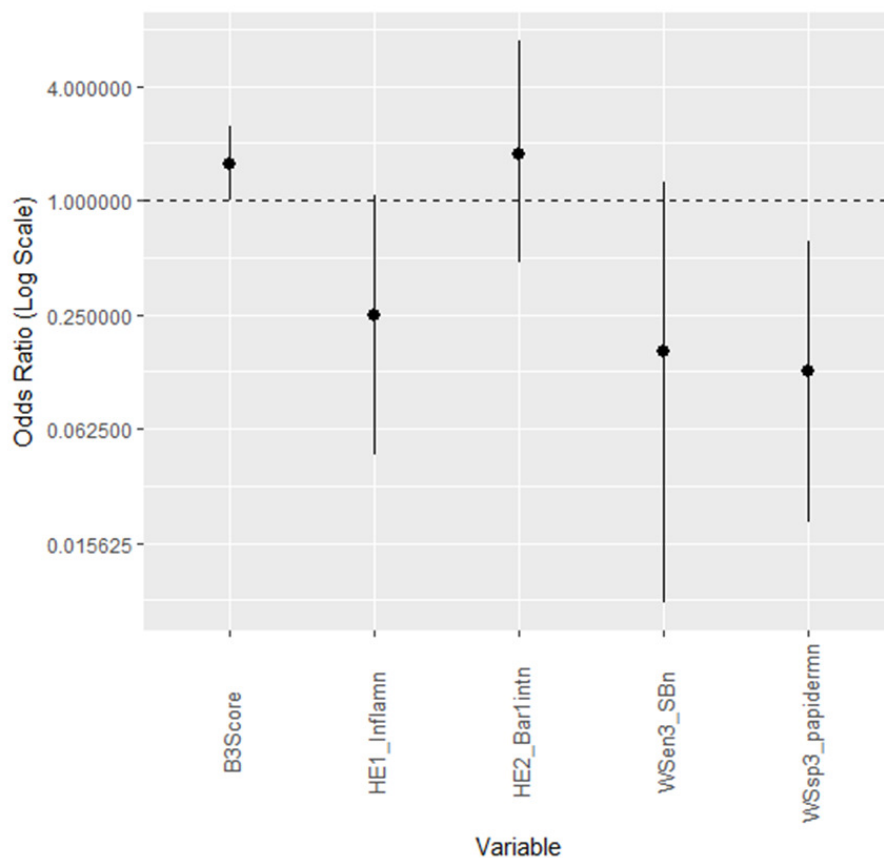


Abbildung 52: Graphische Darstellung der adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe D gegen Gruppe B

Die Abbildung 52 illustriert die Odds Ratio für die Häufigkeit der Zugehörigkeit zu **Gruppe D** verglichen mit **Gruppe B**.

Bei der makroskopischen Läsionsbeurteilung war an Tag 28 ein Parameter relevant. Die dichotomisierten M-Stadien (1 = chronische Läsion (M4+M4.1) und 0 = M2) unterschieden sich statistisch signifikant an Tag 28. Hatte eine Kuh an Tag 28 („B3Score“) eine chronische Läsion, war sie 1,8 mal häufiger in Gruppe D als in B.

Bei der histologischen Läsionsbeurteilung zeigte sich wieder statistisch signifikant eine inhomogene Gruppenzusammensetzung: An Tag 0 waren Tiere mit chronischen Entzündungszeichen im HE-Präparat („HE1_Inflamn“) 4-mal wahrscheinlicher in Gruppe B als Tiere mit akuten Entzündungszeichen. An Tag 14 waren Kühe mit einer histologisch intakten Barrier I 2-mal häufiger in Gruppe D als Tiere ohne intakte Barrier I („HE2_Bar1intrn“). Tiere mit in der Versilberung nachgewiesenen, enzystierten Treponemen bis zum *Stratum basale* („WSen3_SBn“) waren 8-mal häufiger in Gruppe B als Tiere ohne nachgewiesene enzystierte Treponemen bis zum *Stratum basale*. Ebenfalls Tiere mit an Tag 28 in der Versilberung nachgewiesenen, spiralisierten Treponemen bis in die papilläre Dermis („WSsp3_papidermn“), gehörten 10-mal häufiger der Gruppe B an, als Tiere ohne bis dorthin nachgewiesene spiralisierte Treponemen.

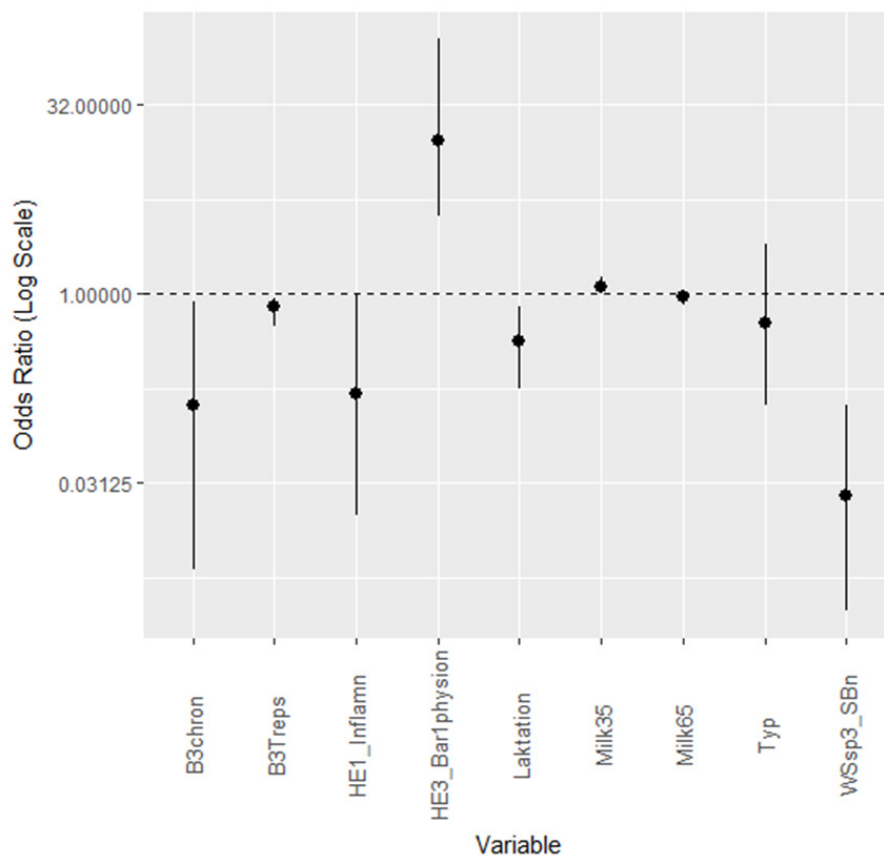


Abbildung 53: Graphische Darstellung der adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe E gegen Gruppe B

Der Forest plot in Abbildung 53 illustriert die Odds Ratio für die Häufigkeit der Zugehörigkeit zu **Gruppe E** verglichen mit **Gruppe B**.

An Tag 0 war ein Tier mit einer Typ-3-Zugehörigkeit 2-mal wahrscheinlicher in Gruppe B, als Tiere mit einer Typ-2-Zugehörigkeit. Somit unterschied sich die Gruppenzusammensetzung vor Behandlungsbeginn hinsichtlich der Kuhtypen statistisch signifikant.

Bei der makroskopischen Läsionsbeurteilung an Tag 28 war ein Tier mit einer proliferativen DD-Läsion 5-mal wahrscheinlicher in Gruppe B, als Tiere mit einer nicht-chronischen oder hyperkeratotischen Läsion („B3chron“).

Kühe, die sich in der Laktation ≥ 2 befanden, waren 3-mal häufiger in der Gruppe B („Laktation“) als Tiere in der ersten Laktation.

Während Tiere mit histologisch nachgewiesenen, spiralisierten Treponemen bis zum Stratum basale in der Gruppe B waren („WSsp3_SBn“), befanden sich die Tiere mit einer intakten Basalmembran in Gruppe E.

Bei der histologischen Läsionsbeurteilung zeigte sich wieder statistisch signifikant eine inhomogene Gruppenzusammensetzung: An Tag 0 waren Tiere mit chronischen Entzündungszeichen im HE-Präparat („HE1_Inflamn“) 4-mal wahrscheinlicher in Gruppe B als Tiere mit akuten Entzündungszeichen. Zudem waren Tiere mit einer histologisch physiologischen Barrier I an Tag 28 wahrscheinlicher in Gruppe E („HE3_Bar1physion“) als Tiere ohne physiologische Barrier I. Tiere mit in der Versilberung histologisch nachgewiesenen, spiralisierten Treponemen bis zum *Stratum basale* waren 30-mal wahrscheinlicher in der Gruppe B („WSsp3_SBn“), als Tiere ohne spiralisierte Treponemen bis zum *Stratum basale*.

Die Anzahl der gezählten Treponemen im Dunkelfeld („B3Treps“), die Milchleistung sowohl an Tag 35 („Milk35“) als auch an Tag 65 („Milk65“) waren in den Gruppen nahezu gleich verteilt.

5.1.4.3.3 Averaged HC-Networks

Die in 5.1.4.3.2 beschriebenen statistisch signifikanten Variablen wurden abschließend auch in einem HC-Network abgebildet, um die gerichteten Beziehungen und Abhängigkeiten der Variablen untereinander darzustellen. So konnte herausgestellt werden, auf was die Behandlungsgruppen statistisch einen

direkten Bezug genommen haben bzw. welche Faktoren die Behandlungsgruppe direkt beeinflusst haben.

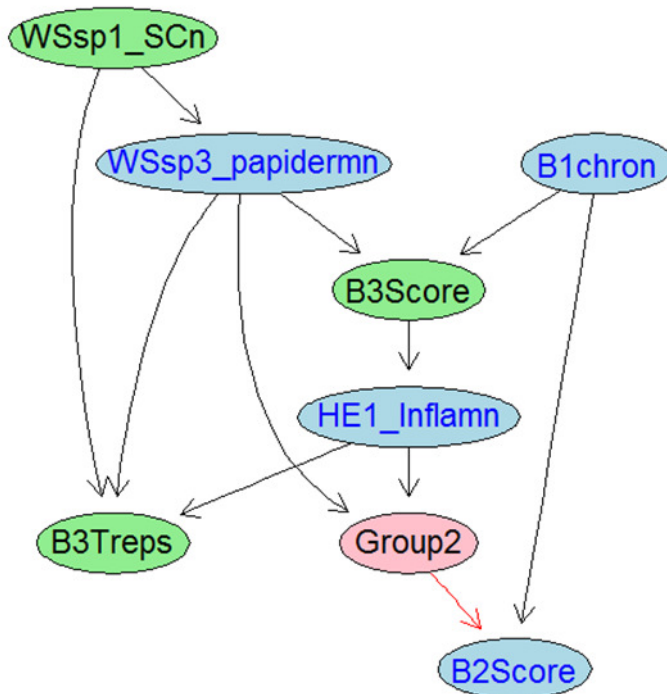


Abbildung 54: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen A verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.488, n=42

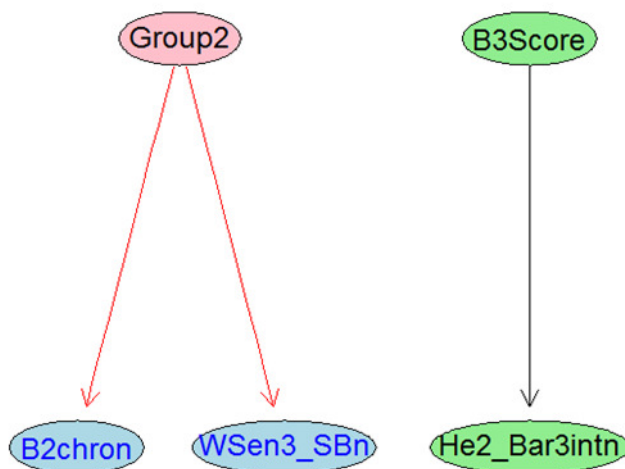


Abbildung 55: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen C verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.562, n=42

Die Abbildung 54 stellt heraus, dass die beiden Variablen „WSsp3_papidermn“ und „HE1_Inflamn“ einen direkten Einfluss auf die Behandlungsgruppe („Group2“) im Vergleich der Gruppe A versus Gruppe B haben. „Group2“ selbst steht in einer gerichteten Beziehung zu dem M-Score an Tag 14 („B2Score“).

In Abbildung 55 zeigt sich hingegen bei dem Gruppenvergleich C versus B, dass „Group2“ unter keinem direkten Einfluss anderer Variablen steht. Vielmehr besteht eine gerichtete Wirkung von „Group2“ auf die Chronizität an Tag 14 („B2chron“) und auf das Vorhandensein enzystierter Treponemen bis zum Stratum basale an Tag 28 („WSen3_SBn“).

Der dargestellte Gruppenvergleich der Gruppe D versus Gruppe B in Abbildung 56 zeigt den Einfluss der Variablen „HE2_Bar1intn“ und „HE1-Inflamn“ auf „Group2“. Dahingegen richtet sich der Einfluss von „Group2“ auf drei Variablen am Studienende. Direkt beeinflusst werden der M-score („B3Score“) und sowohl das Vorhandensein spiralisierter Treponemen bis zur papillären Dermis (WSsp3_papidermn“) als auch der enzystierten Treponemen bis zum Stratum basale.

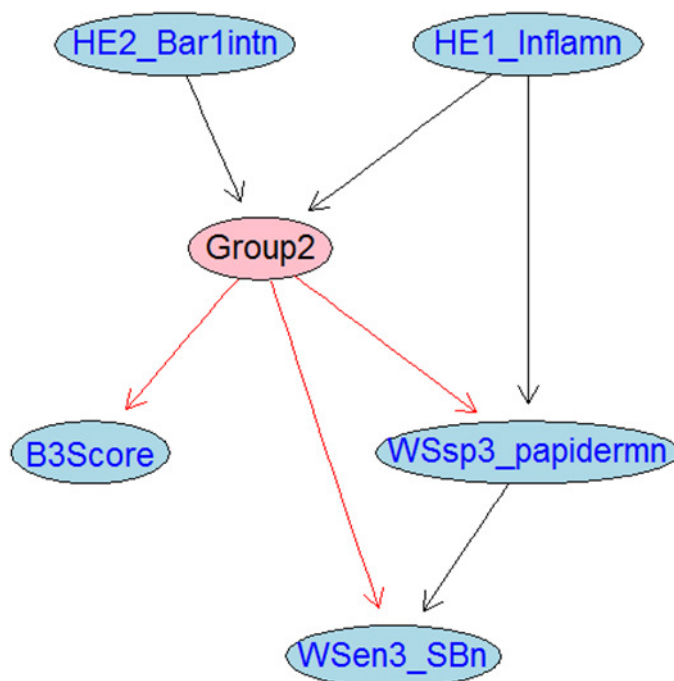


Abbildung 56: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen D verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.496, n=42

Der letzte Vergleich der statistisch signifikanten Ergebnisse der Gruppe E versus Gruppe B in Abbildung 57 zeigt, dass „Group2“ unter keinem gerichteten Einfluss steht. Drei Variablen zum Studienende hin stammen von dem Einfluss der „Group2“ ab. Die Anzahl der Teponemen im Dunkelfeld („B3Treps“), das histologische Vorkommen spiralisierte Treponemen bis zum Stratum basale („WSsp3_SBn“) und die physiologische Dicke der Barrier I in der histologischen Auswertung.

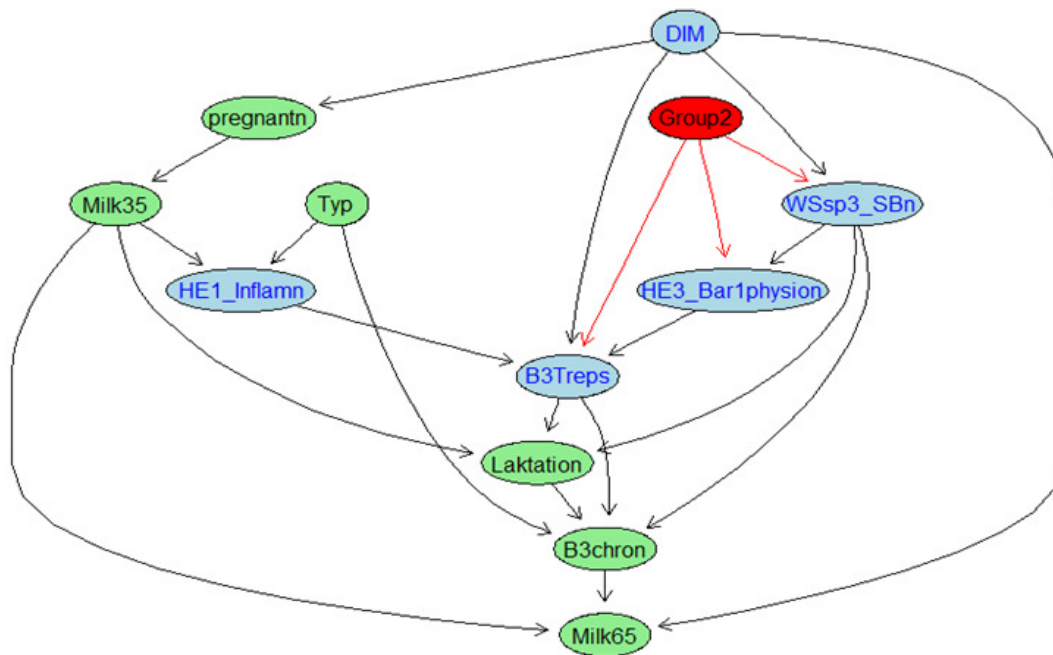


Abbildung 57: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen E verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.488, n=42

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, den Einfluss antibiotischer und nicht antibiotischer Behandlungen auf M2-Läsionen der DD rein klinisch zu erfassen und über Stanzbiopsien die Wirkung auf die Erreger in den Gewebeschichten, sowie die Regeneration des betroffenen Gewebes histologisch zu vergleichen.

6.1 Makroskopie

6.1.1 Auswahl der Studientiere

Alle in die Studiengruppen aufgenommenen Tiere sollten über die zu erfüllenden Aufnahmekriterien, sowie die randomisierte Zuordnung der jeweiligen Behandlungsgruppe, im Durchschnitt die gleichen Ausgangsvoraussetzungen erhalten. Die Vorarbeit auf den Studienbetrieben zur Erfassung der Krankheitsgeschichte der Tiere, ermöglichte die Einteilung in die Untergruppen Kuhtyp-2 und Kuhtyp-3. Auch hieraus sollte sich eine ausgewogene Verteilung der Krankheitsstadien je Gruppe und eine gute anschließende Vergleichbarkeit ergeben. Die Auswertung der erfassten Daten sowohl zur makroskopischen als auch zur mikroskopischen Läsionsbeurteilung zeigte, dass gegenüber den anderen Gruppen in Gruppe B prozentual mehr Tiere mit proliferativen Läsionen sind („B1chron“). Diese Aussage wird auch von den Ergebnissen der histologischen Auswertung unterstützt. Hier zeigte sich, dass Tiere mit bereits histologisch sichtbaren, chronischen Entzündungsanzeichen zum Entnahmezeitpunkt der ersten Biopsie der Gruppe B angehörten („HE1_Inflamn“). Dies sorgte für ein Ungleichgewicht innerhalb der Behandlungsgruppen. Es galt die Frage zu klären, in wie weit die Ergebnisse des Behandlungsvergleichs hiervon belastet wurden.

Bisher durchgeführte Studien arbeiteten immer mit dem Istzustand der vorgefundenen M2-Läsionen zum Zeitpunkt des Studienbeginns (CAPION et al., 2018; FIEDLER et al., 2015; KOFLER et al., 2014; SCHULTZ und CAPION, 2013; SHEARER et al., 2015). Die Ungleichverteilung der Läsions-Chronizität zwischen den Behandlungsgruppen ist ein zufälliges Ereignis. Dieses Ereignis ebenfalls im Voraus über die Studienplanung auszuschließen, macht die Durchführbarkeit der

Studie fast unmöglich, da weder konkrete Aussagen über die tatsächliche Anzahl der bei Studienbeginn vorliegenden M2-Läsionen noch deren Chronizität vorherzusagen ist. Die Anwendung von statistischen Methoden, wie die ‚multiple variable regressions‘, die diese Ungleichgewichte korrigieren, sorgt dafür, dass die ungleiche Verteilung der Anzeichen für Chronizität über die Gruppen so gut wie möglich ausgeglichen werden und die Ergebnisse daher robust und interpretierbar sind. Gleichzeitig wird die Prognose der Behandlungen sehr von der Ohnmacht der Erkennung der unsichtbaren chronischen Eigenschaften der Läsionen beeinflusst. Ein möglicher Rückschluss, der aus den Ergebnissen gezogen werden kann, ist die Hypothese, dass die Abheilungsrate von M2-Läsionen ohne proliferative Veränderungen und mit histologischen Anzeichen einer akuten gegenüber einer chronischen Entzündung nach einer CTC-Behandlung steigt (siehe 5.1.4.3.2).

Die Aufnahme der Studientiere pro Betrieb richtete sich nach den dort auftretenden M2-Läsionen bei dem routinemäßig durchgeführten Klauenschnitt der gesamten Herde. Pro Herdenschnitt konnten deutlich weniger passende Tiere je Betrieb in die Studie aufgenommen werden, als zu Beginn geplant. Hieraus resultiert die unterschiedliche Anzahl an Tieren je Versuchszyklus (Ø 13 Tiere/Betrieb/Versuchszyklus; min. 7 Tiere – max. 30 Tiere). Auf Betrieb 1 wurden drei und auf Betrieb 2 zwei Versuchszyklen durchgeführt. So entsteht eine noch größere Differenz an Studientieren je Betrieb (Ø 21 Tiere/Betrieb; min. 7 Tiere – max. 62 Tiere). Um einen negativen Effekt der Variable Herkunftsbetrieb („Farm“) dieser Tierverteilung ausschließen zu können, wurde diese Variable mit in das Modell der logistischen Regression aufgenommen. Es wurde jedoch kein statistisch signifikantes Ergebnis für den Einfluss der Herkunftsbetriebe errechnet. Ein Einfluss der unterschiedlichen Tierzahl auf das vorliegende Ergebnis der Behandlungsgruppen wurde somit ausgeschlossen.

6.1.2 Auswahl der Medikamente

Die Vielzahl der Forschungsprojekte und veröffentlichten Studien zum Thema DD macht die Schwierigkeit der Handhabung und Behandlung dieser Erkrankung deutlich. Neben zugelassenen Tierarzneimitteln hat sich ein Markt für viele Produkte entwickelt, die ohne wissenschaftliche Nachweise möglicher Wartezeiten auf

tierische Produkte, sowie mit möglichem kaustischen und gesundheitsschädigenden Potential für den Anwender und die Tiere auf den Markt gebracht wurden.

In die Auswahl der zu testenden Produkte dieser Studie wurden lediglich Artikel aufgenommen, die in Deutschland legal zu erwerben und anzuwenden sind. Ein weiteres Kriterium war das Vorliegen mindestens einer wissenschaftlichen Studie mit einer repräsentativen Tierzahl und positivem Behandlungserfolg bei der Anwendung an M2-Läsionen.

Die Verwendung der **Salicylsäure** zur effektiven DD-Behandlung ist aus unterschiedlichen Forschungsgruppen bekannt und findet sowohl in der dänischen, deutschen als auch österreichischen Landwirtschaft eine breite Anwendung (FIEDLER et al., 2015; KOFLER et al., 2014; SCHULTZ und CAPION, 2013). Wichtig für die Anwendung ist die zu berücksichtigende Wartezeit von einem Tag auf Milch sowie essbares Gewebe und die Notwendigkeit einer Verbandsbehandlung, um das Produkt auf der DD-Läsion zu fixieren.

Nach der beschriebenen, vergleichbaren Wirksamkeit der **Polyurethan-Wundauflage** und Salicylsäure, wurde die Wundauflage mit in die Studie integriert (FIEDLER et al., 2015). Fiedler et al., 2015 formulieren im Anschluss an die Studie die offensichtliche, zu schließende Wissenslücke, in wie weit die Polyurethan-Wundauflage einen Einfluss auf die Erreger der DD-Läsion und in den tieferen Gewebeschichten hat. Es wird lediglich angenommen, dass die feuchte Wundheilung eine Akkumulation von Makrophagen und proliferativen Zellen zur erfolgreichen Bekämpfung der Erreger fördert und somit den Heilungsprozess unterstützt (BRYAN, 2004).

Eine klinische Studie verlangt eigentlich über das Studiendesign die Etablierung einer Behandlungsgruppe und einer Kontrollgruppe. In dem Fall einer Studie zu einer behandlungswürdigen Erkrankung ist es schwierig, eine Gruppe von der Behandlung auszuschließen, da die Genehmigung mit der Akzeptanz von unbehandelten, schmerzhaften Läsionen einhergeht. Die Verzögerung der Behandlung könnte als Selbstkontrolle dienen, ist jedoch nicht sehr beliebt, weil auf Grund der langfristigen DD-Erkrankungssituation auf den Betrieben davon ausgegangen werden kann, dass die Spontanheilung der M2-Läsionen einer Kontrollgruppe nicht stattfinden wird. Auf der anderen Seite wäre die Akzeptanz der Betriebsleiter, eine Studie auf ihrem Betrieb durchführen zu lassen, wohl deutlich geringer, wenn offensichtlich erkrankte

Tiere nicht behandelt werden dürfen. Somit wurde die Gruppe B mit der **CTC-Behandlung** als Referenzgruppe gesetzt. Die überwiegende Zahl der Landwirte setzt ein antibiotisches Spray in der lokalen DD-Behandlung ein (BRUMMELMAN et al., 2013; FIEDLER et al., 2015; HOLZHAUER et al., 2017a; KLAWITTER et al., 2016; SCHULTZ und CAPION, 2013; SHEARER et al., 2015). Wird eine Antibiose eingesetzt, so geht man auch von deren Wirksamkeit in Form von klinischer Verbesserung der Wundoberfläche aus. Ein zu testendes Medikament sollte in der Studie also mindestens genauso wirksam wie die Spray-Antibiose sein, um als erfolgreich eingestuft werden zu können. Bei einer wirksamen Antibiose sollte man davon ausgehen können, dass 90% der behandelten Tiere nach abgeschlossener Behandlung einen positiven Heilungserfolg aufweisen. Alle nicht antibiotischen Medikamente dieser Studie werden also im Vergleich zu der antibiotisch behandelten Gruppe B ausgewertet.

Ein Vergleich von Tetrazyklin-Hydrochlorid als Paste oder in Puderform wurde in einer Studie vorgenommen (CUTLER et al., 2013). Das Puder oder die Paste wurde mit einer Bandage auf der zu behandelnden Läsion fixiert. Nach der Behandlung waren an Tag 8-12 je nach Behandlungsgruppe 47.4% und 57.1% als geheilt bewertet. Ein in der gleichen Studie verwendetes Oxytetracyklin-Spray erreichte eine Heilungsrate von 75%. Behandelte Kühe wurden nach Abheilung der Läsionen durch Klauenbäder unterstützt, während in der vorliegenden Studie keine desinfizierenden Klauenbäder angewendet wurden.

Das in der eigenen Studie verwendete CTC-Spray erreichte lediglich einen Anteil an positivem Heilungsverlauf von 38% an Tag 14. Im Verlauf bis Studienende (Tag 28) sank dieser Anteil jedoch noch weiter bis auf 5% ab (5.1.1.2). Diese Ergebnisse lassen sich mit den herausgestellten Ergebnissen einer Studie von Shearer and Hernandez (2000) vergleichen. Sie erhielten eine Heilungsrate im Anschluss einer CTC-Anwendung in Sprayform von lediglich 28% an Tag 14 ihrer Studie.

Diesen niedrigen Erfolgsquoten stehen die positiven Ergebnisse der nicht antibiotischen Behandlungsformen mit einer positiven Heilungsrate von Ø 57,3% (min. 19%-max. 86%) an Tag 14 sowie Ø 46% an Tag 28 (min- 19%-max. 62%) (4.2.7.2) gegenüber.

Zeitlich nahezu parallel wurde eine Studie inklusive der Anwendung von CTC-Spray im Vergleich zu einem TAF-Spray, der Polyurethan-Wundaufgabe, sowie der Salicylsäure-Paste durchgeführt. Auch hier zeigte das CTC-Spray den geringsten

Effekt auf die Verringerung der Läsionsgröße und den Wechsel einer behandelten Läsion (M1, M2, M4) zu M0 oder M3. Dem geringen Anteil der mit CTC-Spray behandelten Läsionen, die an Tag 14 eine Verbesserung zeigten (50%), standen 89% definierter Heilungserfolg der mit Thiamphenicol-Spray behandelten Tiere gegenüber (SEKUL, 2017). Die Ergebnisse der Salicylsäure-Paste und der Polyurethanwundauflage lagen mit 75% und 68% Heilungserfolg dazwischen.

Mündliche Berichte von Landwirten und Tierärzten forderten schon länger den wissenschaftlichen Nachweis ein, ob eine Kombination aus der antibiotischen CTC-Behandlung und der Polyurethan-Wundauflage über die antibiotische Komponente und die positiven Eigenschaften der feuchten Wundheilung nicht zu einer vollständigen Erregerfreiheit führen würde.

Die Ergebnisse der Salicylsäure-Paste von Tag 14 der eigenen Studie (86% Heilungsrate) lagen über dem von Sekul, 2017 herausgestellten Ergebnis. Eine Erklärung für diese Diskrepanz findet sich in der unterschiedlichen Definition des Heilungserfolges.

Auch eine weitere Studie hat den therapeutischen Effekt des Thiamphenicol-Sprays getestet. Die hier beschriebene Heilungsrate beträgt ebenfalls, wie bei Sekul, 2017 89% (HOLZHAUER et al., 2017a; SEKUL, 2017).

Wenn also in folgenden Studien noch eine antibiotische Behandlung als Referenzgruppe integriert werden sollte, erscheint die Verwendung von TAF-Spray anstelle des Chlortetracyclin-Sprays empfehlenswert. Außerdem sollte erwogen werden, an der Verbesserung der Stallhygiene und der Notwendigkeit von präventiven Klauenbädern zu arbeiten. Diese Maßnahmen könnten den Behandlungserfolg steigern.

Das kritische Hinterfragen des Einsatzes von Tetracyclinen bei der Behandlung von DD-Läsionen hat auch noch einen humanmedizinischen Ursprung (KIST, 2016; SCHLAFER, 2012). Vor allem aus dem Bereich der Dentalchirurgie wird eine ernstzunehmende Resistenzlage der *Treponema denticola* nachgewiesen. Diese Treponemen sind an dem Erkrankungsbild der Parodontose beteiligt (ROBERTS et al., 1996). Wenn Treponemen eine Tetracyclinresistenz entwickeln können, so kann dies auch ein Problem in der Behandlung der DD sein und einen Erklärungsansatz für die sehr geringen Heilungsraten darstellen.

Die herausgestellten, nichtantibiotischen Behandlungsmethoden, haben einen positiven Heilungseffekt gezeigt und stellen somit den bedingungslosen Einsatz von antibiotischen Sprays in Frage.

Bei der Behandlung mit dem Kupfer- und Zinkchelat-Spray wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Behandlungserfolg einer erstmalig akut an DD erkrankten Kuh (Kuhtyp 2) und einer chronisch, wiederkehrend mit M2-Läsionen auffallenden Kuh (Kuhtyp 3) herausgestellt. Die Ergebnisse der Gruppe C (Kupfer-Chelatspray) machen deutlich, wie wichtig eine engmaschige Überwachung der gesamten Herde über DD Penwalks ist, um aufkommende M2-Läsionen direkt behandeln zu können. Diese frühe und prompte Behandlung erzielt nicht nur einen höheren Behandlungserfolg bei dem Einzeltier, es senkt gleichzeitig über den Wundverschluss und die Abheilung den vorherrschenden Infektionsdruck im Betrieb.

Die schnelle und vollständige Reduktion der Anzahl der M2-Läsionen in **Gruppe E** auf 0% an Tag 28 sticht auf den ersten Blick sehr positiv hervor (siehe 5.1.1.1.1). Wichtig ist hier die kritische Hinterfragung der Läsionsentwicklung. Neben einer deutlichen Gruppe an entstandenen M4-Läsionen (62%) darf der Anteil an ansteigenden, neuen Verdachtsstadien (M1-Stadien) auf 24% sowie chronisch wieder aufbrechenden M4.1-Läsionen (14%) nicht außer Acht gelassen werden. Vergleicht man die Entwicklung der M-Stadien mit der gezeigten Entwicklung der chronischen Anzeichen der Läsionen, zeigt sich kein Hinweis auf einen Anstieg der proliferativen Läsionen. Vielmehr wird die Entstehung neben den vorhandenen Hyperkeratosen von Läsionen ohne Anzeichen von Chronizität abgebildet. Die Gruppe E zeigt vor allem sehr positive Heilungstendenzen nach der Behandlung der M2-Läsion einer Typ-2 Kuh. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut, wie wichtig eine frühe Detektion der DD-Läsionen und eine prompte Behandlung ist. Die negativen Aspekte dieser Behandlung in Gruppe E sind, neben dem weiteren Einsatz einer Antibiose und der sehr langen, notwendigen Verbandsbehandlung, hohe Kosten für das Produkt der Polyurethan-Wundauflage sowie die zwingende Notwendigkeit, die Einzeltierbehandlung im Klauenstand durchzuführen. Bei der mit einer Antibiose gekoppelten Verbandsbehandlung ist die Gefahr des Eintrages des CTC-Sprays in die Haltungsumwelt der Herde gering und der Verband kann nach der Abnahme gezielt entsorgt werden. Kritisch zu hinterfragen ist jedoch die Tatsache, dass ein antibiotisches Spray über die Dauer der Verbandsbehandlung (14 Tage/Verband) auf der Läsion gehalten wird (RIEDEL, 2003). Es gibt keine wissenschaftlichen Studien

darüber, in wie weit eine mögliche, verstärkte Resorption der Antibiose über das Prinzip der feuchten Wundheilung stattfindet und sich so ein nachweisbarer Wirkstoffspiegel in der Milch aufbaut. Dies ist vor allem bei Medikamenten, die sonst als „frei von Wartezeit“ deklariert sind, als Risiko zu berücksichtigen (CRAMER und JOHNSON, 2015).

6.1.3 Biopsieentnahme

Die Entnahme einer Biopsie aus einer Läsion ermöglicht die Beurteilung der histologisch sichtbaren Schädigungen sowie die Veränderungen auf zellulärer Ebene. Die Entnahme einer solchen Stanzbiopsie und insbesondere die wiederholte Beprobung einer Läsion für die Darstellung eines zeitlichen Verlaufs der Veränderungen in Folge der DD und ihrer Behandlung, setzt einen zusätzlichen Reiz in das bereits veränderte Gewebe. Eine mögliche Beeinflussung des Heilungsprozesses durch die Biopsieentnahme oder eine mögliche Entzündungsinduktion kann nicht ausgeschlossen werden. Der zusätzliche Informationsgewinn durch die Biopsieentnahmen für ein Verständnis der vorliegenden Erkrankung und die darin enthaltenen Informationen für die Interpretation folgender Studienergebnisse ist sehr wertvoll und nimmt die mögliche Beeinflussung der Wundheilung in Kauf. Die positiven Entwicklungen im Anschluss an die Behandlungen vor allem der Gruppen C, D und E stellen heraus, dass trotz einer Biopsieentnahme eine Heilungstendenz nicht zwingend negativ beeinflusst wird (CAPION et al., 2018). Das Risiko, durch eine Biopsie in einem Behandlungsversuch eine Läsion zu induzieren, ist laut Literatur kaum gegeben (CAPION et al., 2013).

6.1.4 M-Score und Heilungsverlauf

Der Begriff Heilung selbst wird klar in die zwei Untergruppen der Reparation und der Restitutio ad integrum gegliedert (PSCHYREMBEL et al., 1994). Folgt auf einen Defekt die Heilung in Form der Reparation, kommt es zur Wiederherstellung der Funktion durch Ersatz mit Narbengewebe. Lediglich die Restitutio ad integrum führt zur Wiederherstellung des vorangegangenen, unversehrten Zustands.

Für die Beurteilung des jeweiligen Behandlungserfolges der Medikamente wurden mehrere Erfolgskriterien festgelegt. Neben der Elimination der Treponemen im histologischen Schnitt, wurde sowohl die positive (Übergang in M0, M3, M4 Stadium) als auch negative Entwicklung (Übergang in M1, M2, M4.1 Stadium) nach Behandlung einer M2-Läsion in dieser Studie definiert (5.1.1.2).

In den meisten Behandlungs- oder Präventions-Studien von DD wird die Zielgröße der Heilung neu definiert (CAPION et al., 2018; DOPFER et al., 1997; HOLZHAUER et al., 2017a; SEKUL, 2017). Abhängig von der Falldefinition und somit der Ausgangssituation ist die Vergleichbarkeit der Studien unmöglich.

Bei dem rein klinischen Vergleich zweier antibiotischer und nicht antibiotischer Behandlungen von M1, M2 und M4 Läsionen wurde eine Verbesserung an Tag 15 in Richtung M3 oder M0 als Zielgröße definiert (SEKUL, 2017). Bei einer weiteren Studie mit dem klinischen Vergleich zweier antibiotischer Spray-Behandlungen von M2-Läsionen wird Heilung als Entwicklung zu M0 oder M4 definiert (HOLZHAUER et al., 2017a). Diese Definition wurde auch für die Auswertung einer früheren Studie für die Anwendung von Intra Hoof-fit Gel im Vergleich zu CTC-Spray bei der Behandlung von M2-Läsionen verwendet (HOLZHAUER et al., 2011).

Eine Schwierigkeit, trotz vergleichbar erscheinender Ergebnisse, ist die klinische Bewertung der Läsionen in der Studie selbst. Die beschriebene und bildlich dargestellte M0-Läsion und somit als geheilt definierte Läsion bei (HOLZHAUER et al., 2017a), zeigt noch eine deutliche Hyperkeratose entlang des ZKS. Für eine M0 sollte auch der ZKS ohne einen Befund sein (DOPFER et al., 1997; FIEDLER et al., 2015). In der hier durchgeführten Studie wurde der ZKS-Befund bei jeder Läsionsbeurteilung mit einbezogen. Dies war möglich, da alle Befundungen der Studientiere am aufgehobenen Fuß im Klauenpflegestand stattgefunden haben. Zu einem Befund gehören sowohl Hyperkeratosen entlang des ZKS, als auch Veränderungen innerhalb der plantaren bzw. palmaren Tasche des ZKS. Die Beurteilung des ZKS und deren Einbeziehung in die Befundung wurde bei Holzhauer nicht beschrieben. Für die Beurteilung einer DD-Freiheit (M0) ist dies jedoch notwendig. Hinzu kommt, dass vorhandene Läsionen in der Tasche des ZKS einer Spray-Behandlung oder einer oberflächlichen Reinigung und Desinfektion bei dem Durchschreiten eines Klauenbads entgehen und ein unentdecktes DD-Reservoir darstellen können. Es wurde gezeigt, dass in hyperkeratotischen M4-Läsionen noch

Treponemen nachweisbar sind (KULOW et al., 2017). Tiere mit offensichtlichen Hyperkeratosen als vollständig geheilt zu beurteilen sollte kritisch hinterfragt werden. Lediglich in der Auswertung der histologischen Präparate, ist über die Regeneration der Hautschichten und dem Nachweis der Abwesenheit der Erreger ist Heilung zu sehen (CAPION et al., 2018).

In einer Metaanalyse bereits vorliegender Studien zur Behandlung oder Prävention von DD, wurde die Problematik der Vergleichbarkeit bearbeitet und abschließend die Notwendigkeit einer einheitlichen Definition eines positiven Behandlungserfolgs gefordert (HEMLING, 2017).

6.2 Mikroskopie

6.2.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die gewonnenen Erkenntnisse aus der Auswertung der HE-Schnitte ermöglichen bei einer klinischen Studie Rückschlüsse auf die vorliegende Situation im Gewebe zu ziehen. Neben der rein binären Beschreibung der vorliegenden Gewebestruktur fiel die unterschiedliche Entwicklung der Epidermis auf. Viele Präparate wiesen eine epidermale Hyperplasie auf. Diese reichte von einer physiologischen Konformation der Barrier II (100-150 µm) bis hin zu einer massiven Verbreiterung (> 300 µm). Die überwiegende Zahl der Präparate wies eine reguläre Bildung der Reteleisten auf. Einige wenige Präparate wiesen irreguläres Wachstum und in wenigen Fällen auch pseudokarzinomatöses Wachstum auf. Die Vergesellschaftung von Treponemen mit anderen Bakterien ist ein bekanntes Phänomen und tritt bei einer Großzahl der untersuchten Präparate auf. In einigen Fällen war das massive Vorkommen besonders bemerkenswert, wenn es räumlich eng mit absterbenden Treponemen verbunden war.

6.2.2 Versilberung nach Warthin-Starry

In der histologischen Auswertung der versilberten Schnitte wurde das Vorkommen der Treponemen in den unterschiedlichen Tiefen der Hautschichten strikt mit ja (1) oder nein (0) bewertet, um anschließend eine klare Ausgangslage für die statistische

Analyse zu schaffen. Das Kriterium „keine Treponemen vorhanden“ war klar definiert. Im Verlauf der Auswertung wurde deutlich, dass das Kriterium „Treponemen vorhanden“ zwar klar definiert ist, jedoch eine sehr große Spannbreite von „sehr vereinzelter Vorkommen“ über „moderate Besiedlung“ bis hin zu „massivem Vorkommen“ der Treponemen abdeckt. Im Rahmen einer Behandlungsstudie kann die Erfassung der Reduktion und nicht ausschließlich der geforderten Elimination der Erreger ein wichtiger, zu erfassender Trend sein. Bisherige Studien haben überwiegend mit einmaligen Probenentnahmen am Schlachthof gearbeitet (BORKERT et al., 2013; DOPFER et al., 1997; KULOW et al., 2017). Hierbei war nicht die Verlaufsbeschreibung eines Behandlungserfolgs, sondern vielmehr die Erfassung des Endpunktes möglich. In einer in 2018 veröffentlichten Studie wurden hingegen auch vor der Behandlung (1.Biopsie) einer akuten oder chronischen Läsion und nach befundeter Abheilung oder bei definiertem Versuchsende an Tag 30 Biopsien (2.Biopsie) entnommen (CAPION et al., 2018). Es wurde ebenfalls eine Versilberung nach Warthin-Starry vorgenommen und anschließend das Vorkommen der Treponemen in 4 Untergruppen bewertet (0=keine, 1=wenige, 2= moderates Vorkommen mit geringer Eindringtiefe, 3=massives Vorkommen mit Besiedlung der Dermis). Das definierte Ziel der Heilung wurde bei Capion neben der klinischen Freiheit von Anzeichen einer DD Erkrankung mit der Abwesenheit der Treponemen im histologischen Schnitt gleichgesetzt.

Eine erweiterte Auswertung der bereits vorliegenden histologischen Präparate, um neben der Elimination auch eine mögliche Reduktion mit einem angepassten Bewertungsprotokoll zu erfassen, wäre als Erweiterung des vorliegenden Projekts umsetzbar.

Mit einem Fokus bei der histologischen Auswertung der versilberten Schnitte auf die Proben mit einer Zusammenhangstrennung innerhalb der Barrier III hat sich gezeigt, dass enzystierte und spiralisierte Treponemen trotz bestehender Möglichkeit nicht viel weiter in die Dermis einwandern. Der überwiegende Anteil der Besiedlung bleibt auf Barrier II und III beschränkt.

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung der Versilberung im Hinblick auf die Elimination der Treponemen aus den Gewebeschichten unterstreicht den bereits in 5.1.1.2 herausgestellten, deutlichen Unterschied im Heilungsverlauf der unterschiedlichen Kuh-Typen der **Gruppe C**. Einhergehend mit der signifikant besseren Abheilungsrate der M2-Läsionen des Kuh-Typ-2 in der makroskopischen

Läsionsbeurteilung, stellt das Ergebnis der histologischen Analyse eine ähnliche Entwicklung heraus. In Gruppe C befinden sich 7 Biopsien, in denen an Tag 28 nach Behandlung keine Treponemen mehr nachweisbar sind. Sechs dieser Proben gehören zu Tieren des Kuh Typ-2 und lediglich ein Tier gehört der Kuh Typ-3 Gruppe an.

Auch die Ergebnisse der Gruppe D hinsichtlich der Erregerelimination unterstreichen das in 5.1.1.2 beschriebene Ergebnis. Gruppe D zeigt sowohl in der Auswertung der makroskopischen, als auch in der mikroskopischen Läsionsbeurteilung ein ausgewogenes Ergebnis zwischen den unterschiedlichen Kuh-Typen.

6.2.3 Dunkelfeldmikroskopie

In der Dunkelfeldmikroskopie wurde die Anzahl der aus der Probe ausgewanderten Treponemen, die mögliche Kontamination des OTEBs sowie die Vitalität der Treponemen bewertet.

Eigentlich sollte man davon ausgehen können, dass am Tag des Studienbeginns (Biopsie I) alle Proben eine detektierte Anzahl an Treponemen von mindestens ≥ 1 aufweisen. Die Auswertung der vorgefundenen Treponemen weist jedoch auf, dass sechs Proben der Gruppe E den Wert 0 aufweisen. Die Annahme, dass jede Biopsie einer M2-Läsion Treponemen enthält wird mit dem Untersuchungsverfahren der Auswanderung und dem Nachweis über die Dunkelfeldmikroskopie nicht bestätigt. Die zusätzlich durchgeführte Versilberung der Proben zeigt aber deutlich, dass alle Proben zu Beginn der Studie mit Treponemen belastet waren. Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Untersuchungsmethoden macht deutlich, dass die alleinige Beurteilung der Proben über die Dunkelfeldmikroskopie als Nachweis spiralisierter Bakterien in einem flüssigen Medium sehr spezifisch und sensitiv ist. Jedoch kommt es durch Treponemen, die nicht in der Lage sind aus der Probe aus- und in das OTEB einzuwandern, zu falsch negativen Ergebnissen hinsichtlich des Vorliegens von Treponemen in der Gewebeprobe. Für die Beurteilung der Vitalität der bereits ausgewanderten Treponemen eignet sich die Methode der Dunkelfeldmikroskopie sehr gut.

Für eine Erhöhung der Spezifität der Aussage, ob eine Probe Treponemen enthält oder nicht, kann die Dunkelfeldmikroskopie auch um einen DNA-Nachweis (LAMP-Test) ergänzt werden. Über diese Methodenkombination kann eine schnelle Aussage

sowohl über das Vorliegen als auch die Vitalität der Treponemen vorgenommen werden, ohne das zeitaufwändige Aufbereiten der Proben für eine histologische Auswertung durchzuführen.

6.2.4 Kombinierte Auswertung der Makroskopie und Mikroskopie

In der vorliegenden statistischen Auswertung des Projekts wurden sowohl die Variablen der makroskopischen Läsionsbeurteilung als auch die der mikroskopischen Probenauswertung gemeinsam betrachtet. Nach Herausstellung der statistisch signifikanten Variablen können diese für neue Studiendesigns als Zielgrößen genutzt werden, oder als Grundlage einer erweiterten Berechnung der bearbeiteten Studie dienen. Für das Auffinden passender Ergebnisvariablen ist es wichtig, ob eine Studie nur die makroskopische, die mikroskopische oder beide Betrachtungen einer Läsion miteinschließt.

Bei einer rein makroskopischen Betrachtung der Läsionen kann darauf geschlossen werden, dass proliferative Läsionen histologisch chronische Entzündungsanzeichen aufweisen. Zusätzlich weist der Großteil an hyperkeratotischen M4-Läsionen eine Besiedlung mit Treponemen in den oberen Hautschichten auf. Bei der makroskopischen Beurteilung können die M-Stadien M0, M3 und M4-hyperkeratotisch als positives Bewertungskriterium zusammengefasst werden. Diesem stehen als negatives Ergebnis die Entwicklung einer behandelten Läsion zu den M-Stadien M1, M2, M4-proliferativ und M4.1 gegenüber.

Über die „Averaged HC-Networks“ wurden die gerichteten Beziehungen zwischen den statistisch signifikanten Variablen dargestellt. Ein paar auffällige Ergebnisse sollen hier noch einmal auf ihre praktische Relevanz hin diskutiert werden.

Eine Abhängigkeit bestand darin: Wenn in Biopsie I im *Stratum corneum* spiralisierte Treponemen nachweisbar sind („HE1_Inflam“), dann werden im Auswanderungsverfahren für die Dunkelfeldmikroskopie der Biopsie III auch Treponemen nachgewiesen werden („B3Trep“). Dieser Zusammenhang muss relativiert werden, da in dem Großteil der Biopsien I durch die erosive Oberfläche der beprobten M2-Läsion gar kein *Stratum corneum* mehr beurteilbar war. Dieser dargestellte Zusammenhang bezieht sich also lediglich auf die Proben, die noch oder wieder über Inseln der Hautoberfläche im Wundbereich verfügten. Diese Läsionen werden meist als Hyperkeratosen in der makroskopischen Läsionsbeurteilung

aufgenommen und stellen eine überschießende Produktion von Hornzellen dar. Geht man also davon aus, dass primär bereits chronisch veränderte Läsionen in der ersten Biopsie noch Reste des *Stratum corneum* aufwiesen, so sind es diese chronischen Läsionen, bei denen aus der dritten Biopsie noch vermehrt Treponemen ausgewandert sind. Diese Beobachtung deckt sich mit einem Ergebnis aus der Logistischen Regression. Dort zeigte sich der Zusammenhang zwischen der histologisch chronischen Entzündung („HE1_Inflamn“) sowie der makroskopisch befundeten Chronizität in Biopsie I („B1chron“) und der in Biopsie III weiterhin vorliegenden makroskopischen Chronizität der Läsion („B3chron“). Man kann davon ausgehen, dass in diesen chronischen Läsionen der Biopsie III ebenfalls Treponemen vorliegen (CAPION et al., 2018; DOPFER et al., 1997).

Das gemeinsame Averaged HC-Network der **Gruppen A** und **B** zeigt, dass proliferative Läsionen („B1chron“) nicht nur einen Einfluss auf die makroskopische Läsions-Befundung an Tag 14 („B2Score“), sondern auch auf die Befundung nach vier Wochen hat („B3Score“). Dieses Ergebnis unterstreicht erneut die Notwendigkeit der frühen Detektion und prompten Behandlung einer aufkommenden akuten DD-Läsion.

Sowohl die vergleichende Betrachtung der Gruppen A und B als auch der Gruppen B und D ergibt, dass die Behandlung einen direkten Einfluss auf das Ergebnis der makroskopischen Läsionsbeurteilung an Tag 14 und Tag 28 hat.

Aus der gemeinsamen Betrachtung der **Gruppen B** und **E** ergibt sich, dass der Kuh-Typ sowohl einen Einfluss auf die histologischen Anzeichen einer vorliegenden chronischen Entzündung in Biopsie I („HE1_Inflamn“), als auch auf einen makroskopischen, chronischen Befund zum Zeitpunkt der dritten Biopsie („B3chron“) hat. Abschließend zeigt sich noch ein Einfluss der chronischen Läsionen zum Zeitpunkt des Studienendes (Tag 28) und der Milchleistung der Tiere an Tag 65 nach Studienbeginn („Milk65“). Greift man diese Ergebnisse auf und zieht die beschriebene Heritabilität für DD mit in die Betrachtung ein, so eröffnet sich neben den Chancen der lokalen Behandlung von DD-Läsionen und der beschriebenen Prävention eine zusätzliche Hypothese (SCHÖPKE et al., 2015).

Aus diesem Zusammenhang würde man die folgende Frage beantworten müssen: Ist es möglich, mit der Detektion und dem Einsatz passender Bullen, Tiere des Kuh-Typs 1 und 2 zu züchten?

Für eine erfolgsversprechende Anpaarung ist das Vorliegen des Kuh-Typs der zu belegenden Tiere notwendig. Neben der gezielten Anpaarung für eine verbesserte Nachzucht ermöglicht die strikte Überwachung des Jungviehs auch die gezielte Selektion von Tieren, die aufgrund der Zugehörigkeit zum Kuh-Typ 3 schon vor dem Belegen für die Remontierung im Milchviehbereich ausgeschlossen werden können. Auch wenn dies noch keine prompte Freiheit von der DD-Problematik verspricht, unterstützt die Überwachung die langfristige Entwicklung, wobei nur Tiere auf dem Betrieb behalten werden, die über präventive Maßnahmen sowie nichtantibiotische Behandlungsmethoden gut zur Abheilung von DD Läsionen gebracht werden können.

6.3 Klinische Relevanz

Soweit bekannt, existieren bisher zwar einige ähnliche klinische Untersuchungen zum Vergleich von bis zu fünf verschiedenen oberflächlichen Behandlungsmethoden, jedoch gibt es bisher keine vorliegende wissenschaftliche Studie, die den Vergleich auf Gewebeebene, sowie die sich unterscheidenden Kuh-Typen, mit einbezogen hat. Neben dem praktischen Vergleich der Behandlungen erfolgte in der vorliegenden Studie Grundlagenforschung in dem Bereich des Vergleichs der Kuh-Typen und deren möglichen unterschiedlichen Heilungsverläufen im Anschluss an eine Behandlung. Klinisch und histologisch konnten neue Ergebnisse für ein besseres Verständnis der DD herausgestellt werden. Aber auch bereits international vorliegende Forschungsergebnisse wurden mit dieser Arbeit nachvollzogen und weiter gestützt.

Die Studie beinhaltet auch eine möglichst wirtschaftliche Behandlung für die Landwirtschaft herauszuarbeiten. Hierbei soll das Gleichgewicht aus Arbeitsaufwand pro abgeschlossener Behandlung, Kosten für das anzuwendende Produkt sowie der zu erwartende Behandlungserfolg den Aufwand der lokalen Behandlung optimieren. Neben der bereits dargestellten Problematik der möglichen Resistenzentwicklung von Keimen gegenüber CTC-Spray, einhergehend mit den sehr geringen Behandlungserfolgen, muss abschließend auch die Problematik einer Aerosolbildung bei einer Spraybehandlung für den Anwender angesprochen werden. Vor allem Klauenpfleger sind bei der täglichen Arbeit auf Betrieben mit DD-Problematik einer ständigen Aerosolbelastung nach Anwendung eines antibiotischen Sprays ausgesetzt.

6.4 Schlussfolgerungen

Die durchgeführte Studie hatte zum Ziel, wirkungsvolle nichtantibiotische Alternativen zu dem viel genutzten CTC-Spray zu finden. In der Studie wurde deutlich, dass wirksame, alternative Behandlungsmethoden nicht zwingend aufwendig sein müssen. Die **Gruppen A** (Mortella Heal) und **E** (Mortella Heal+CTC) sind durch ihr Behandlungsschema sehr zeitintensiv und das Produkt ist in der Anschaffung in einem deutlich höheren Preissegment angesiedelt als die Produkte der **Gruppen C** (Repiderma) und **D** (Novaderma). Repiderma und Novaderma bedürfen beide einer primären Verbandsbehandlung. Hierbei unterscheiden sich die beiden Produkte im Aufwand nur gering. Repiderma muss nach der Verbandsabnahme noch zwei Mal im Abstand von zwei Tagen auf die M-Läsion aufgesprüht werden. Jede Behandlung ist mit direkter Arbeit verbunden. Die Ergebnisse der Studie haben aber gezeigt, dass sich die Produkte der Gruppen C und D für zwei unterschiedliche Betriebssituationen anbieten. Auf Betrieben mit einer guten, regelmäßigen Überwachung der DD-Situation durch Penwalks oder das Beurteilen der Klauen im Melkstand und der eingeschlossenen Jungviehüberwachung, können Typ-2 und Typ-3 Tiere unterschieden werden. Die Ergebnisse der makroskopischen als auch histologischen Läsionsbeurteilung haben gezeigt, dass Repiderma einen signifikant höheren Effekt bei der Behandlung von M2-Läsionen der Typ-2 Kühe gegenüber der Typ-3 Kühe hat.

Novaderma weist unabhängig von der zugehörigen Kuh-Typ-Gruppe gleichmäßige Ergebnisse im Behandlungserfolg auf. Dieses Produkt ist geeignet sowohl für die Behandlung von Typ-3 Kühen auf dem zuvor skizzierten Betrieb oder allgemein der Behandlung von DD-Läsionen mit chronischen Anzeichen. Durch die Salicylsäure hat Novaderma die Möglichkeit, die obersten Zellschichten mit den darin massiv vorkommenden Treponemen abzustößen. Novaderma ist kein hochpreisiges Produkt, dass in der Lage ist mit einem angemessenen Arbeitseinsatz einer Verbandsbehandlung bei akuten sowie chronischen DD-Läsionen gleichermaßen für einen umgehenden Wundverschluss und eine deutliche Erregerreduktion in den Gewebeschichten zu sorgen.

Von elementarer Bedeutung ist die Einbeziehung des Jungviehs in den Präventions- und Behandlungsplan. Prompte Detektion und Behandlung von DD-Läsionen senkt die DD-Prävalenz bereits in der nachwachsenden Milchvieh-Generation. Tiere mit

großen, chronischen Läsionen heilen kaum wieder ab. In der Milchviehherde kann mit Novaderma die vorherrschende Situation von chronischen Läsionen und vereinzelt auftretenden akuten Läsionen kontrolliert werden. Wiederkehrende Fälle sollten ausgesiebt werden um den Infektionsdruck und die einhergehende Arbeitsbelastung gering zu halten.

Die durchgeführte Studie zeigt, dass es möglich ist, DD ohne Antibiotikum erfolgreich zu behandeln. Eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche, nichtantibiotische Behandlungsform, ist die frühe Detektion sowie ein promptes behandeln. Unabhängig von der Unterscheidung zwischen antibiotischen und nichtantibiotischen Behandlungsmethoden, muss man dem Punkt Sorge tragen, dass jedes Mittel, das auf eine beschädigte Hautoberfläche aufgetragen wird, aufgenommen werden kann. Insbesondere bei landwirtschaftlichen Nutztieren ist hier Vorsicht geboten, wenn sie der Lebensmittelgewinnung dienen.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass jede Spray-Behandlung, egal ob antibiotisch oder nichtantibiotisch ein Gesundheitsrisiko für den Anwender darstellt, da Aerosole eingeatmet werden können.

Der geringe jedoch stetige und angemessene Einsatz von Arbeitszeit, Produkt und Arbeitskraft bietet den Weg zu einer nachhaltigen Verbesserung der Klauengesundheit und insbesondere der DD-Prävalenz auf einem Betrieb. In dieser Studie haben die Behandlungsgruppen C (Repiderma) und D (Novaderma) ohne den Einsatz von Antibiotika einen Behandlungserfolg gezeigt, der im Zusammenspiel aus Arbeitsaufwand, Produktkosten und zu erwartendem Behandlungserfolg eine wirtschaftliche Bekämpfungsstrategie der DD aufgezeigt hat. Der Einsatz von Chlortetracyclinspray hat bei keinem Tier der Studiengruppe (B) einen positiven Heilungserfolg bis Tag 28 erzielt. Die Ergebnisse der Studie sprechen somit klar gegen den Einsatz von Antibiotika in der topischen Behandlung von DD-Läsionen.

Um das Bewusstsein für die Relevanz der frühen Läsionsdetektion und die Chance auf einen prompten und zufriedenstellenden Behandlungserfolg bei geringem Produkteinsatz und personellem Aufwand zu steigern, ist die Veröffentlichung der Ergebnisse der vorliegenden Studie in regionalen, landwirtschaftlichen Medien sowie international über Fachjournale besonders wichtig. Bei kontinuierlicher Detektion der M-Stadien, prompter Behandlung und gezielter Selektion, sinkt die Zahl der zu

behandelnden Tiere in der Herde auf ein Minimum. Hier eingesetzte Präventionsmaßnahmen kontrollieren den vorherrschenden Infektionsdruck. Um diesen Status auf einem Betrieb zu erreichen, können folgende Empfehlungen aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie herausgezogen werden. Das Bewusstsein für die DD-Prävention muss schon in den Jungviehstallungen anfangen, um langfristig und nachhaltig einen Erfolg in der Behandlung von DD zu erreichen.

6.5 Ausblick

Uns liegen keine Hinweise vor auf ähnliche Untersuchung in dem vorliegenden Umfang zum Thema der klinisch und histologisch vergleichenden, antibiotischen und nicht-antibiotischen oberflächlichen Behandlung bei DD, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Kuh-Typen. Zudem ist die Gesamtheit der hier in Kombination betrachteten Medikamente ebenfalls in keiner Veröffentlichung zu DD verwendet worden. Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs deuten darauf hin, dass es möglich ist, DD ohne antibiotische Behandlungen auf einem Betrieb mit einer strikten Umsetzung eines erarbeiteten Präventionsplans unter Kontrolle zu behalten und die wirtschaftlichen Verluste zu minimieren.

Die Kontrolle der DD nimmt viel Zeit neben der normalen zu leistenden Arbeit auf Milchviehbetrieben in Anspruch. In Abhängigkeit der verwendeten Medikamente muss insbesondere in landwirtschaftlichen Betrieben ein wirtschaftlicher Verlust aufgrund obligatorischer Wartezeiten mit eingerechnet werden. Zusätzlich sollte der Einsatz von Antibiotika bei Nutztieren, selbst wenn es nur lokal angewendet wird, minimiert werden, um das Risiko der Resistenzentwicklungen bei Mikroorganismen zu verringern (CHEE-SANFORD et al., 2001).

Um diese Probleme anzugehen, sind alternative Behandlungsmethoden erforderlich. Die unterschiedlich erfolgreichen Behandlungsergebnisse der hier vorliegenden Versuchsgruppen zeigen, dass diese Alternativen bereits mit einer sehr guten Wirksamkeit gegen DD auf dem Markt sind.

7 Zusammenfassung

Die Dermatitis digitalis (DD) des Rindes wurde erstmals Mitte der 1970er-Jahre in Italien detektiert und beschrieben. Seitdem breitet sich die Erkrankung sowohl in Europa als auch international aus. In den vergangenen zehn Jahren wurde nach langer beschriebener Freiheit die Erkrankung auch in Chile und Neuseeland nachgewiesen. DD hat sich somit zu einem internationalen Problem rinderhaltender Betriebe entwickelt. Die momentanen Forschungsergebnisse weisen die zu den Spirochäten gehörenden Treponemen, als primären Erreger der DD aus.

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss antibiotischer und nicht antibiotischer Behandlungen auf M2-Läsionen der DD klinisch zu erfassen und über Stanzbiopsien die Wirkung auf die Erreger in den Gewebeschichten sowie die Regeneration des betroffenen Gewebes histologisch zu vergleichen, um eine mögliche Elimination oder Reduktion der Erreger feststellen zu können.

Für die Datenerhebung wurden insgesamt bei 105 Tieren von fünf bayrischen, Milchviehbetrieben, jeweils eine M2-Läsion (>2cm) mit einem von fünf antibiotischen und nicht-antibiotischen Produkten behandelt. Abschließend befanden sich jeweils 21 Tiere in jeder Behandlungsgruppe. Jede Behandlungsgruppe war sowohl aus Typ2 und Typ3-Kühen zusammengestellt. Die Versuchsphase auf den Betrieben erstreckte sich von August 2016 bis Juni 2017. Neben der klinischen Verlaufskontrolle wurden an Tag 0, 12 und 28 Stanzbiopsien (Ø 6mm) unter lokaler Anästhesie des Wundbereichs entnommen.

Die Proben wurden halbiert und sowohl der Histologie, als auch der Dunkelfeldmikroskopie für ein Auswanderungsverfahren der Treponemen zugeführt. Die Auswertungen der M-Stadien zeigen deutliche Unterschiede in dem Heilungsverlauf der Studiengruppen hinsichtlich der M2-Reduktion, Entwicklung von M4.1-Läsionen und Ausbildung chronischer Krankheitsstadien. Die Produkte wurden in der statistischen Auswertung jeweils in einen Vergleich zu einer Chlortetracyclin-Spray-Gruppe gestellt. In der histologischen Auswertung sind statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bei der Reduktion der

Treponemen aus den tiefen Gewebeschichten, dem intakten, langfristigen Wundverschluss, sowie den frühen Anzeichen einer chronischen Entzündung herausgestellt worden. Die frühen, histologischen Anzeichen einer chronischen Entzündung korrelieren hierbei mit der makroskopischen Bewertung einer proliferativ veränderten Läsion.

Zusammenfassend war festzustellen, dass wirksame Produkte ohne Antibiotika für die oberflächliche Behandlung akuter Läsionen der DD auf dem Markt vorhanden sind. Zwar kann keine Heilung mit den in die Studie einbezogenen Medikamenten erreicht werden, aber auch die eingesetzte Antibiose vermochte dies nicht zu erfüllen. Es ist möglich, eine akute, schmerzhaft Läsion mit nichtantibiotischen Produkten zu behandeln, um in kürzester Zeit eine schmerzfreie, verschlossene Läsion zu erreichen. Diese Erkenntnisse werden durch die Auswertung der Histologie unterstützt. Zwar kommt es nicht zu einer vollkommenen Erregerfreiheit, aber es wird die Möglichkeit der Regeneration der Gewebeschichten nach dem Verschluss der Wunde erreicht.

8 Summary

New ways to preserve claw health - comparative study on the efficacy of antibiotics and antibiotic-free treatments for digital dermatitis (Mortellaro disease)

Digital dermatitis (DD) is an international problem on beef and dairy farms and was first described in 1974. Damaged and infected skin shows erosive and painful open lesions. The typical lesion is located on the hind legs at the coronary band. More than 80 % of German dairy farmers have to deal with DD on their farms. Due to the high number of infected animals, a lot of drugs are in use. Tetracycline spray is a commonly used topical treatment containing antibiotics, that is used in the milking parlor or while hooftrimming. After topical treatment is judged effective by positive clinical evaluation many relapses occur throughout the herds, supposedly caused by encysted *Treponema* in the epidermal layers. To reduce the amount of dispensed drugs it is necessary to find an effective, pain reducing and sustainable treatment without a large pharmacological input into the environment.

The superficial treatments are compared in this study. An antibiotic (chlortetracycline spray), different antibiotic-free treatments (salicylic acid, polyurethane bandage, copper-chelate spray) and a combination (chlortetracycline spray + polyurethane bandage) are used.

In preparation for the study all data on claw health was collected on five Bavarian dairy farms during the routine trim to get the individual disease history of every cow. Based on this dataset the cows were randomly split into five different treatment groups and an even number of type-2 and type-3 cows added up to 21 cows per group. The on farm work of the trial was accomplished from August 2016 until June 2017. The study is innovative in performing three biopsies on the lesions during the healing process on day 0, 12 and 28 under local anesthesia and comparing the success of each treatment clinically and histologically. This way, not only the clinical effect on the surface of the lesions, but also the effect on the bacteria in deeper tissue layers can be evaluated. The main questions to be solved in this study are whether antibiotic-free products have the same positive effect on the eradication or

reduction of bacteria as an antibiotic treatment and is there an effect of a superficial treatment of DD in the deeper layers of the skin?

Each biopsy was split in half for performing histology and dark field microscopy. The evaluations of the M-stages show big differences in the ability of eliminating M2-stages, the development of M4.1-lesions and the outcome of chronic signs.

For the statistical analysis each treatment group was compared to the antibiotic treatment (ctc-spray). There were statistical significant differences between the groups in the reduction of Treponemes in the deeper skin layers, a proper wound closure over time and the development of early signs for a chronic inflammation. These early signs of chronic inflammation were correlated to the proliferative lesions from the macroscopic scoring with the M-stages.

The results of the study show, that there are effective non-antibiotic treatments available for DD without the risk of antimicrobial resistance. Neither one of the antibiotic free products nor the antibiotic product have shown the efficacy to actually cure DD. The antibiotic free products show the ability to eliminate pain and to close the wound quickly. This statement is supported by the histological findings. There is no total eradication of the Treponemes from the tissue, but the possibility of tissue regeneration beyond the wound closure.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kristallviolett-Färbungen eines ausgestrichenen, hitzefixierten.....	27
Abbildung 2: Darstellungen der M-Stadien.....	28
Abbildung 3: LAMP-Test Auswertung unter UV-Licht.....	33
Abbildung 4: Durchtreibbestände für die Klauenpflege; A: Klauenpflegestand 800-1 (KVK), B: Top 5 (Rosensteiner), C: Priefert (Texas Trading), D: Speed-Fix (Ametsreiter)	37
Abbildung 5: Fischgrätenmelkstand, Automatisches Melksystem (AMS), Melkkarussell	40
Abbildung 6: A: Penwalk, Kühe im Fressgitter fixiert, B: Läsionsbeurteilung in einer Kleingruppe von Tieren, C: Läsionsbeurteilung inkl. ZKS mit Sprengzange im Klauenstand, D: Läsionsbeurteilung während des Melkens.....	44
Abbildung 7: Beispiel für die Dokumentation der in die Studie integrierten M2-Läsion an der rechten Hintergliedmaße der Kuh 455(Transpondernummer) mit der zugeordneten, fortlaufenden Nummer 32 und die Entnahmestellen der Stanzbiopsien Tag 0 (blau), Tag 12 (rot) und Tag 28 (grün).	49
Abbildung 8: Reinigung der Zehen (1), Lokalanästhesie um die zu beprobende Läsion (2) und Biopsieentnahme aus einer M2-Läsion an einer linken Hintergliedmaße (3+4), Reinigung des Biopats (5) und Transport in 1 ml OTEB.	50
Abbildung 9: Schematische Darstellung der ersten Aufbereitungsschritte des entnommenen Biopats.	50
Abbildung 10: Fotografische Zuordnung einer fortlaufenden Nummer (c2) zur individuellen Kuhidentifikation (Ohrmarke) und Transpondernummer mit der zugehörigen M2-Läsion im Versuchsverlauf an Tag 0, 12, 28	57
Abbildung 11: Behandlungsgruppen A-E mit applizierten Medikamenten vor Verbandsanlegung; F: Anlegen eines mit synthetischer Watte unterpolsterten Verbandes	59
Abbildung 12: Verteilung der M-Stadien aller Behandlungsgruppen (A-E); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=105 Kühe aus 5 Betrieben	72
Abbildung 13: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen A (Pen 1); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme),	

Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben.....	73
Abbildung 14: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen B (Pen 2); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben.....	74
Abbildung 15: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen C (Pen 3); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben.....	75
Abbildung 16: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen D (Pen 4); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben.....	76
Abbildung 17: Verteilung der M-Stadien der Behandlungsgruppen E (Pen 5); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für die folgenden zwei Wochen), n=21 Kühe aus 5 Betrieben.....	77
Abbildung 18: Entwicklung der Chronizität aller Behandlungsgruppen (A-E); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=105 Kühe von 5 Betrieben.....	78
Abbildung 19: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (A)); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben.....	79
Abbildung 20: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (B);); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben.....	80
Abbildung 21: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (C); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben.....	81

Abbildung 22: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (D); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben.....	82
Abbildung 23: Entwicklung der Chronizität der Behandlungsgruppe (E); Die Werte der x-Achse (Week) repräsentieren den zeitlichen Verlauf. Week 1 (erste Biopsieentnahme), Week 3 (zweite Biopsieentnahme), Week 5 (dritte Biopsieentnahme), Pred. (Tendenz für Folgewochen), n=21 Kühe von 5 Betrieben.....	83
Abbildung 24: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 14 der Gruppen A,B,D,E aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = $M_0+M_3+M_4$; neg incl $M_1 = M_1+M_2+M_4.1$	84
Abbildung 25: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 14 der Gruppe C aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = $M_0+M_3+M_4$; neg incl $M_1 = M_1+M_2+M_4.1$	85
Abbildung 26: Vierfeldertafel zur Bestimmung des P-Wertes im Kuh-Typ Vergleich der Gruppe C an Tag 14 nach Anwendung des Fisher's Exact Test (P-Wertes < 0,05).....	85
Abbildung 27: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 28 der Gruppen A, B, D, E aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = $M_0+M_3+M_4$; neg incl $M_1 = M_1+M_2+M_4.1$, n= 21 Datenpunkte/Gruppe aus fünf Betrieben.....	86
Abbildung 28: prozentuale Verteilung (pos/neg) der M-Stadien an Tag 28 der Gruppe C aufgeteilt nach Kuh-Typ 2 und 3 aus der Gesamtbetrachtung; positiv = $M_0+M_3+M_4$; neg incl $M_1 = M_1+M_2+M_4.1$, n= 21 Datenpunkte/Gruppe aus fünf Betrieben.....	87
Abbildung 29: Vierfeldertafel zur Bestimmung des P-Wertes im Kuh-Typ Vergleich der Gruppe C an Tag 28 nach Anwendung des Fisher's Exact Test (P-Wert < 0,05).....	87
Abbildung 30: spiralisierte Treponemen unter dem Dunkelfeldmikroskop, 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	88
Abbildung 31: Durchschnittliche Anzahl spiralisierter Treponemen, die an Tag 0, 14 und 28 in den Proben einer Behandlungsgruppe über die Dunkelfeldmikroskopie nachgewiesen wurden; grün zeigt eine positive, rot eine negative Entwicklung an; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	89
Abbildung 32: Ergebnisse der Treponemenzählung im Gruppenvergleich sowie im zeitlichen Verlauf über die Biopsieentnahmen I-III; Anzahl der Treponemen wurde in 4 Gruppen unterteilt mit 0=keine Treponemen, 1=1-10 Treponemen, 2=11-50 Treponemen und 3= ≥ 50 Treponemen.....	90

Abbildung 33: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des OTEB-Transportmediums; spiralisierte, aus einer Biopsie ausgewanderte Treponeme und der Anschnitt eines Erythrozyten (Stechapfelform) auf der rechten Bildseite	91
Abbildung 34: Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop; Darstellung der Wundoberfläche einer M2-Läsion nach Biopsieentnahme; A: einzeln vorkommende, spiralisierte Treponemen (dünne, weiße Pfeile) und Stäbchenbakterien (dicker, weißer Pfeil); B: Cluster von Treponemen (dünne, weiße Pfeile) und einem Erythrozyten in Stechapfelform (dicker, weißer Pfeil).....	92
Abbildung 35: negativer Heilungsverlauf von Kuh Nr. 70 (Gruppe B) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 12, 28.....	93
Abbildung 36: Beispielhafte Darstellung einer Hyperkeratose (A) und einer Orthokeratose (B) an Tag 14; Bild C zeigt beispielhaft eine nicht mehr intakte Barrier I-III an Tag 0, Bild D zeigt die Wiederherstellung der Kontinuität des Zellverbandes an Tag 14 von Barrier I-III; der Maßstab entspricht 1 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	94
Abbildung 37: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 2 (Gruppe A) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 14, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 0,5 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	95
Abbildung 38: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 5 (Gruppe B) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 14, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 1 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	96
Abbildung 39: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 3 (Gruppe C) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 14, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 1 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	97
Abbildung 40: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 1 (Gruppe D) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 12, 28; der Maßstab entspricht in A-C 1 cm und in D-F 0,5 mm; 40 fache Vergrößerung (Carl Zeiss, Axiolab)	98
Abbildung 41: positiver Heilungsverlauf von Kuh Nr. 4 (Gruppe E) in der klinisch (A-C) - histologischen (D-F) Gegenüberstellung an Tag 0, 12, 28.....	99
Abbildung 42: Vergleichende Darstellung klinischer M2-Läsion an Tag 28 der Kuh 70 (A) versus M4-Stadium Tag 28 der Kuh 35 (C) sowie Versilberung nach Warthin-Starry an Tag 28 der beiden Kühe. Der angegebene Maßstab in den histologischen Abbildungen entspricht 1 mm (B,D) und 1 cm (A,C).....	100
Abbildung 43: Histogramm DIM aller Versuchstiere mit 1=0-60 DIM, 2=61-120 DIM, 3=121-270 DIM, 4≥271 DIM	102

Abbildung 44: Histogramm zur Darstellung der Verteilung der Anzahl der Abkalbungen je Studentier	103
Abbildung 45: Histogramme zur Verteilung der Milchleistung der Studentiere an Tag -5, 35, 65	104
Abbildung 46: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot A vs B from dd7ABx.RData, n=42	106
Abbildung 47: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot C vs B from dd7CBx.RData, n=42	107
Abbildung 48: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot D vs B from dd7DBx.RData, n=42	108
Abbildung 49: Ausschnitt aus dem Final Bayesian Network plot E vs B from dd7EBx.RData, n=42	108
Abbildung 50: Graphische Darstellung der Adjusted Odd Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe A gegen Gruppe B	109
Abbildung 51: Graphische Darstellung der Adjusted Odd Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe C gegen Gruppe B	111
Abbildung 52: Graphische Darstellung der adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe D gegen Gruppe B	112
Abbildung 53: Graphische Darstellung der adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus dem Vergleich der Gruppe E gegen Gruppe B	113
Abbildung 54: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen A verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.488, n=42	115
Abbildung 55: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen C verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.562, n=42	115
Abbildung 56: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen D verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.496, n=42	116
Abbildung 57: Averaged HCNetwork der statistisch signifikanten Parameter aus der logistischen Regression der Gruppen E verglichen mit Gruppe B; bootstrap 500, threshold=0.488, n=42	117
Abbildung 58: Final Bayesian Network plot A versus B aus dd7ABx.RData, n=42	157

Abbildung 59: Final Bayesian Network plot C versus B aus dd7CBx.RData, n=42.....	158
Abbildung 60: Final Bayesian Network plot D versus B aus dd7DBx.RData, n=42.....	159
Abbildung 61: Final Bayesian Network plot E versus B aus dd7EBx.RData, n=42	160
Abbildung 62: Graphische Darstellung der adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus den Vergleichen der Gruppe A gegen Gruppe B (1), Gruppe C gegen Gruppe B (3), Gruppe D gegen Gruppe B (4), Gruppe E gegen Gruppe B (5)	161

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung von Dermatitis digitalis nach Doepper (DOPFER et al., 1997)	7
Tabelle 2: Beschreibung der Erscheinungsformen der Kuh-Typen (DOEPFER, 2009)	11
Tabelle 3: Locomotion Score nach Sprecher (SPRECHER et al., 1997)	17
Tabelle 4: Übersicht der Aufstallungen auf den Versuchsbetrieben	36
Tabelle 5: Kuh Typen modifiziert nach Döpfer (DOEPFER, 2009)	38
Tabelle 6: Diagnoseschlüssel Klauenerkrankungen (modifiziert nach DLG-Ausschuss „Klauen-gesundheit und Klauenhygiene“)	46
Tabelle 7: Aufbau der histologischen Beurteilungskriterien der HE-Schnitte	55
Tabelle 8: Übersicht über die Behandlungsgruppen	58
Tabelle 9: Darstellung des Versuchsablaufs zeitlich auf dem Betrieb und im Labor	62
Tabelle 10: Rasseverteilung der Studientiere	71
Tabelle 11: Verteilung der Tiere je Studienbetrieb	71
Tabelle 12: Auswertung der Anzahl vorhandener Treponemen absolut und je Gewebeabschnitt; aufgeteilt nach Biopsieentnahme I,II und III	101
Tabelle 13: Anzahl der Tiere pro Behandlungsgruppe und Kuh-Typ, bei denen in der dritten Biopsie (Tag 28) keine Treponemen in der Versilberung nach Warthin-Starry mehr nachweisbar waren	102
Tabelle 14: Auflistung und Beschreibung der korrelierenden oder statistisch signifikanten Variablen aus der multivariaten Analyse	105
Tabelle 15: Beispielhafte Datenerfassung der kuhassoziierten Datenpunkte	155
Tabelle 16: Beispielhafte Datenerfassung sowohl der Auswertung der HE-Präparate, als auch der versilberten Probenschnitte	156

11 Anhang

Ablauf der Probenentnahme:

- Kontrolle der Kuh auf der Liste nach Möglichkeit Typ2/3
- Es dürfen keine den Hornschuh durchbrechenden Sekundärläsionen an der Klaue zu sehen sein
- Zuordnung der folgenden skalierten Fotokarte => auf Liste notieren
- Foto Karte + HB/OM, anschließend Foto+ Läsion vor der Probenentnahme
- Fuß mit Aloe Vera Spül-Lotion (Marke Frosch) und Bürste waschen, anschließend Sprüh-Desinfektion (Sterilium, BODE Chemie GmbH)
- 6 ml Procamidol zur Lokalanästhesie
- 18 ml Ketoprosol i.m. verabreichen
- Pinzette, frische Biopsiestanze, frisches Skalpell und Wasserflasche bereithalten
- Biopsieentnahme
- Biopsie mit Wasser aus Flasche kurz abspülen und in das OTEB geben => Probenflasche mit Nummer beschriften
- Erneutes Foto der Läsion => Dokumentation der Entnahmestelle
- Behandlung der Läsion je nach Versuchsgruppe und gepolsterter Verband
- Markierung der Kuh mit dem Viehzeichenstift jeweils rechts und links mit einem großen Buchstaben der Versuchsgruppe auf der Kruppe
- LCS nach Verlassen des Standes

Product Insert

ORAL TREPONEME ENRICHMENT BROTH (OTEB)

Products:

AS-603 Oral Treponeme Enrichment Broth (OTEB) 10 tubes / pkg

Intended Use

OTEB is an enriched medium used for the isolation, cultivation and maintenance of *Treponemes* found as part of the oral flora.

Summary

OTEB is a complex peptone-yeast extract medium containing volatile fatty acids and serum for a source of long chain fatty acids. Volatile fatty acids and serum are necessary nutrients for recovery of *Treponemes* from the oral flora. Inoculation of the medium can be done using a gassing cannula or inside an anaerobic chamber. This medium is prepared, stored and dispensed under oxygen-free conditions to prevent the formation of oxidized products prior to use.

Formula (g/L)

Proteose Peptone #2	5.0 g
Heart Infusion Broth	5.0 g
Yeast Extract	5.0 g
Potassium Phosphate, dibasic	2.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Magnesium Sulfate, Heptahydrate	0.2 g
Acetic Acid	1.6 mL
Propionic Acid	0.6 mL
N-Butyric Acid	0.4 mL
N-Valeric Acid	0.1 mL
Isovaleric Acid	0.1 mL
Isobutyric Acid	0.1 mL
2-Methylbutyric Acid	0.1 mL
Vitamin K ₁ (1.0% solution)	1.0 mL
L-Cysteine (25.0% solution)	2.0 mL
Calf Serum	100.0 mL
Sugar Stock	100.0 mL
DI Water	800.0 mL
<hr/>	
Sugar Stock Solution	
Glucose	8.0 g
Fructose	8.0 g
Sucrose	8.0 g
Maltose	8.0 g
Ribose	8.0 g
Xylose	8.0 g
Pectin	8.0 g
Soluble Starch	8.0 g
Sodium Pyruvate	8.0 g
Thiamine Pyrophosphate	750.0 µg
DI Water	1.0 L

Final pH 7.0 +/- 0.2 at 25 degrees C.

Final volume 7.0 mL +/- 0.7.

Precautions

For *IN VITRO DIAGNOSTIC USE* only. Approved biohazard precautions and aseptic techniques should be observed when using this product. This product is for use only by properly-trained and qualified personnel. Sterilize all biohazard waste prior to disposal.

Storage and Shelf Life

Storage: Upon receipt, store at room temperature (13°C - 27°C) in original container until use. Avoid overheating or freezing. Do not use medium if there are signs of deterioration (shrinking, cracking or discoloration due to oxidation of media) or contamination. The expiration date applies to the product in its original packaging and stored as directed. Do not use product past the expiration date shown on the container.

Shelf Life: 6 months from date of manufacture.

Procedure

Specimen Collection: Specimens for anaerobic culture should be protected from oxygen during collection, transportation and processing. Consult appropriate references for detailed instructions concerning collection and transportation of anaerobes.

Methods for Use: OTEB should be inoculated directly with clinical material. Inoculated tubes should be immediately placed in an anaerobic atmosphere and incubated at 35-37°C for 48 – 96 hours. Some oral treponeme strains may require 1 – 2 weeks to achieve sufficient growth. Detailed instructions for processing anaerobic cultures can be found in the appropriate references.

Materials Required But Not Provided

Standard microbiological supplies and equipment such as loops, saline blanks, slides, staining supplies, microscope, incinerator / autoclave, incubators, anaerobic chamber or anaerobic jar, disinfectant, other culture media and serological and biochemical reagents.

Limitations

OTEB will not provide complete information for identification of bacterial isolates. Additional test procedures and media are required for complete identification. Consult reference materials for additional information.

Quality Control

OTEB should support good growth of most *Treponemes* found in oral specimens.

The following organisms are routinely used for quality assurance performance testing at Anaerobe Systems.

Organism Tested	ATCC #	Results	Time (Hours)
<i>Treponema denticola</i>	33521	Growth	72 – 96
<i>Treponema phagedenis</i>	27087	Growth	72 – 96
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8482	Growth	24
<i>Bacteroides fragilis</i>	25285	Growth	24
<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845	Growth	24 – 48
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	25286	Growth	24
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	25586	Growth	24
<i>Clostridium perfringens</i>	13124	Growth	24
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337	Growth	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Growth	24

User Quality Control: The final determination to the extent and quantity of user laboratory quality control must be determined by the end user.

If sterility testing is to be performed on this product, the appropriate percentage of the original shipment amount should be incubated anaerobically and aerobically for 48 – 96 hours.

If the nutritive capacity of this medium is to be tested for performance, it is recommended that the following ATCC organisms be evaluated for growth.

Organism	Expected Growth
<i>T. denticola</i>	48-72 hrs
<i>T. phagedenis</i>	72-96 hrs
<i>B. fragilis</i>	24 hrs
<i>S. aureus</i>	24 hrs

Physical Appearance: OTEB should appear clear golden yellow in color with a slight precipitate due to the high concentration of serum in a 16mm x 100mm glass tube.

References

1. Dowell, V. R., Jr. and T. M. Hawkins. 1974. *Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology*. CDC Laboratory Manual. USDHEW C. D. C. Atlanta, GA 30333.
2. Holdeman, L. V., F. P. Cato and W. E. C. Moore. 1977. *Anaerobe Laboratory Manual*. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, VA 24061.
3. Jousimies-Somer, H. R., Summanen, P., Citron, D. M., Baron, E. J., Wexler, H. M. and S. M. Finegold. 2002. *Wadsworth – KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. Star Publishing Co., Belmont, CA 94002.
4. Engelkirk, P.G., Duben-Engelkirk, J., Dowell, V.R. 1992. *Principles of Practices of Clinical Anaerobic Bacteriology*. Star Publishing Co., Belmont, CA 94002.
5. Isenberg, H. D. 1992. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. American Society for Microbiology Publishing, Washington, D.C. 20005.
6. Ballows, A., et al. 1991. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Publishing, Washington, D.C. 20005.
7. NCCLS. *Quality Control for Commercially Prepared Microbiological Culture Media; Approved Standard- Third Edition*. (2004). NCCLS document M22-A3. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898.

Revision Date: 9/1/15

Tagesabläufe eines Versuchszyklusses

Tag	Ort	Tätigkeit	Anmerkungen
0	Betrieb	Kauenpflege, 1.Biopsieentnahme , VB-Behandlung, Fotodokumentation	
	Labor	Biopsien gekühlt in das Labor bringen	
1	Betrieb	VB-Abnahme+Nachbehandlung Gruppe B , Fotodokumentation, Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien in frisches OTEB, Treponemen mit Hämozytometer zählen im Dunkelfeld beurteilen, Biopsiehälfte in Formalin, LAMP-Vorbereiten	
2	Betrieb	Nachbehandlung Gruppe B , Fotodokumentation, Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
3	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
4	Betrieb	Verbandsabnahme Gruppe C + Nachbehandlung, Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
5	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
6	Betrieb	Verbandsabnahme Gruppe D , Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
7	Betrieb	Nachbehandlung Gruppe C , Fotodokumentation, Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
8	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen	
9-11	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umstellen und in Paraffin gießen	
12	Betrieb	VB-Abnahme von Gruppe A+E , 2.Biopsieentnahme , VB-Behandlung aller Kühe Fotodokumentation	
	Labor	Biopsien gekühlt in das Labor bringen	
13	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien in frisches OTEB, Treponemen mit Hämozytometer zählen im Dunkelfeld beurteilen, Biopsiehälfte in Formalin, LAMP-Vorbereiten	
14	Betrieb	VB-Abnahme Gruppe B,C,D, Fotodokumentation, Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
15	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
16	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
17	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	

	Labor	Biopsien umgießen	
18	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
19	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
20	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien in Paraffin gießen	
21	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Proben schneiden	
22-25	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Proben trocknen	
26	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Proben schneiden	
27	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Proben trocknen	
28	Betrieb	VB-Abnahme von Gruppe A+E, 3.Bipsieentnahme , VB-Behandlung aller Kühe, Fotodokumentation	
	Labor	Biopsien umgießen	
29	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien in frisches OTEB, Treponemen mit Hämozytometer zählen im Dunkelfeld beurteilen, Biopsiehälfte in Formalin, LAMP-Vorbereiten	
30	Betrieb	VB-Abnahme Gruppe B,C,D , Fotodokumentation, Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
31	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
32	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
33	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien umgießen	
34	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Biopsien ins Paraffin gießen	
35-44	Betrieb	Kontrolle der Tiere auf dem Betrieb	
	Labor	Proben färben	
45	Betrieb	VB-Abnahme von Gruppe A+E , Fotos	
	Labor	Proben färben	

Score sheet 1 (Ausschlusskriterien aus dem Versuch bei der Eingangsuntersuchung)

Proben-Nr.: _____

Beurteilungskriterien	Score	0	1	2	3	4	5
Verhalten		Kuh reagiert auf Untersucher interessiert, ist aufmerksam,	Kuh reagiert verzögert auf Untersucher	Kuh reagiert stark verzögert auf Untersucher, ist matt, apathisch	Kuh reagiert kaum auf Untersucher, ist depressiv	Kuh ist somnolent, reagiert nicht auf Untersucher, reagiert nur auf massive Umweltreize	Kuh ist komatös, lässt sich auch durch massive Umweltreize nicht zu Reaktionen erwecken
Klauenpflege		Klauen sind physiologisch geformt und ohne Anzeichen von Defekten	Rehe Grad 1	Gehe Grad 2	Läsion am Hornschuh Grad 1	Läsion am Hornschuh Grad 2	Läsion am Hornschuh Grad 3
Bewegung		Kuh belastet alle vier Gliedmaßen, Rückenlinie gerade, Kopf wird locker von Hals und Nacken getragen, Ohren werden dem Untersucher zugewandt	Kuh belastet alle vier Gliedmaßen, Rückenlinie im Stehen gerade, Kopf leicht gesenkt, beim Gehen ist die Rückenlinie leicht gekrümmt	Kuh belastet eine Gliedmaße ggr weniger in der Bewegung, Rückenlinie im Stehen und beim Gehen leicht gekrümmt, Kopf wird tief getragen	Kuh entlastet ein Bein, mgr Lahmheit, Rückenlinie gekrümmt, verkürzte Schrittlänge	Kuh belastet ein Bein gar nicht, hgr lahm	Kuh liegt fest
Atmung		AF 60 – 80, Kuh atmet ruhig und gleichmäßig, normale Atemtiefe	AF 60 – 80, Kuh atmet ruhig und gleichmäßig, jedoch flach	AF 80 – 100 Kuh atmet unregelmäßig frequent und tief	AF 100 – 120, Kuh atmet flach aber regelmäßig	AF > 120, Kuh atmet unregelmäßig und flach	für mehr als 30 Sekunden Atemstillstand

Betrieb: _____ Halsband Nr: _____ Datum Tag 1: _____ Unterschrift: _____

Wenn in einem der Beurteilungskriterien der Belastungsscore entweder summativ 5 oder der einzelne Score eines Kriteriums 3 beträgt, wird das Tier nicht als Versuchstier herangezogen. Auf dem Betrieb wird die Tierärztin alle Untersuchungen der für den in Frage kommenden Versuch selbst durchführen und entscheiden, ob ein Tier für den Versuch herangezogen werden kann oder nicht.

Aufzeichnungsplan

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Lahmheit																												
Schwellung																												
Rötung																												
Entlastung der Gliedmaße																												
Verlust Verband																												

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Fieber																												
Systemische Antibiose																												
Erhöhung des LCS																												
Phlegmone																												
Sekundäre Erkrankung																												

Proben-Nr.: _____ Betrieb: _____ Halsband Nr: _____ Datum Tag 1: _____ Unterschrift: _____

1. Spezielle Haltungs- und Pflegemaßnahmen

--> Handlungsanweisungen zu Punkt 1 und 2: Wird ein Fach mit einem Plus markiert muss der versuchsbetreuende Tierarzt umgehend informiert werden

Score sheet 3 (Ausschlusskriterien aus dem Versuch während der Versuchsphase)

Proben-Nr.: _____

Beurteilungskriterien	Score	0	1	2	3	4	5
Bewegung		Kuh belastet alle vier Gliedmaßen, Rückenlinie gerade, Kopf wird locker von Hals und Nacken getragen, Ohren werden dem Untersucher zugewandt	Kuh belastet alle vier Gliedmaßen, Rückenlinie im Stehen gerade, Kopf leicht gesenkt, beim Gehen ist die Rückenlinie leicht gekrümmt	Kuh belastet eine Gliedmaße ggr weniger in der Bewegung, Rückenlinie im Stehen und beim Gehen leicht gekrümmt, Kopf wird tief getragen	Kuh entlastet ein Bein, mgr Lahmheit, Rückenlinie gekrümmt, verkürzte Schrittlänge	Kuh belastet ein Bein gar nicht, hgr lahm	Kuh liegt fest
Schwellung/ Rötung		Alle Gelenke sind trocken und die Gliedmaßen werden gleichmäßig belastet	Fessel ist gerötet, nicht schmerzhaft	Fessel ist gerötet, ggr. Kronschaumswellung, nicht schmerzhaft	Fessel ist deutlich gerötet Fuß bis zu den Afterklauen geschwollen Kuh ist lahm/ schmerzhaft	Fessel ist geschwollen, Kuh zeigt ggr. Lahmheit	Kuh belastet den geschwollenen Fuß nicht mehr
Atmung		Kuh atmet ruhig und gleichmäßig, normale Atemtiefe AF 60 - 80	Kuh atmet ruhig und gleichmäßig, aber nur ca. die Hälfte des normalen Atemzugvolumens	Kuh atmet unregelmäßig in Frequenz und Atemtiefe AF 80 - 100	Kuh atmet flach aber noch regelmäßig AF 100 - 120	Kuh atmet unregelmäßig und flach AF > 120	Atemstillstand für mehr als 30 Sekunden
Behandlung		Kuh erhält keine zusätzlichen Futtermittel zur vorgelegten Ration	Kuh bekommt ein Ergänzungsfuttermittel	Kuh erhält eine Infusion	Kuh wird mit einem antibiotischen Euterinjektor behandelt	Kuh erhält eine systemische Antibiose	Kuh erhält eine systemische Antibiose und Schmerzmittel
Rektaltemperatur		38,5 - 39,0 °C	39,0 – 39,3 °C	39,4 – 39,5 °C	39,6 – 39,7 °C	39,8 – 39,9 °C oder 38,0 – 38,4 °C	>= 40,0 oder < 38,0 °C

Betrieb: _____ Halsband Nr: _____ Datum: _____ Unterschrift: _____

Wenn in einem der Beurteilungskriterien der Belastungsscore entweder summativ 5 oder der einzelne Score eines Kriteriums 3 beträgt, wird das Tier nicht als Versuchstier herangezogen. Auf dem Betrieb wird die Tierärztin alle Untersuchungen der für den in Frage kommenden Versuch selbst durchführen und entscheiden, ob ein Tier für den Versuch herangezogen werden kann oder nicht.

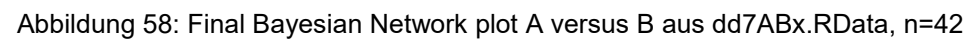
Tabelle 15: Beispielhafte Datenerfassung der kuhassoziierten Datenpunkte

Probe_Nr	HB_Name	OM	Betrieb	Bein	Datum_Versuchsbeginn	Vater	Rasse	Kuh_Typ	Behandlung	Buchstabe	Laktation_Nr	letztes_Kalbedatum	d_Kalbung_vor_Versuchsbeginn_Tage in Milch	tragend_bei_Versuchsbeginn	Milch_kg_Tag_min_5	Milch_kg_Tag_35	Milch_kg_Tag_65	Datum_Abgang	Abgangsgrund	Versuchsabschluss ja_nein
1	80	DE0948014033	Miller	HL	08/24/16	Ellmau	rbt	2	Novaderma	D	2	08/17/16	5	nein	0	29	26			ja
2	102	DE0948014070	Miller	HL	08/24/16	Ellmau	rbt	3	MH	A	1	04/05/16	140	ja	20	18	17			ja
3	138	DE0948937758	Miller	HR	08/24/16	Elwood	rbt	2	Repiderma	C	1	05/16/16	100	nein	24	20	20			ja
4	151	DE0948937764	Miller	HL	08/24/16	Brasil	sbt	2	MH_CTC	E	1	07/13/16	40	nein	21	16	14	12/21/16	krankes_Knie	ja
5	99	DE0947039564	Miller	HR	08/24/16	Tableau	rbt	3	Cyclo	B	3	06/02/16	80	nein	40	34	28			ja
6	12	DE0948937752	Miller	HL	08/24/16	Tablett	rbt	3	Repiderma	C	1	04/12/16	130	nein	21	21	20			ja
7	66	DE0948937769	Miller	HL	08/24/16	Davos	rbt	2	Novaderma	D	1	07/22/16	35	nein	25	24	21			ja
8	157	DE0948014064	Miller	HR	08/24/16	Ellmau	rbt	3	MH_CTC	E	1	02/19/16	180	nein	25	20	20			ja
9	83	DE0948014067	Miller	HL	08/24/16	Tablett	rbt	3	MH	A	1	04/12/16	135	ja	20	17	18			ja
10	60	DE0948937755	Miller	HR	08/24/16	Hansl	brv	2	Cyclo	B	1	07/30/16	25	nein	19	20	20			ja
11	61	DE0948014060	Miller	HL	08/24/16	Ellmau	rbt	3	Repiderma	C	1	12/28/15	150	ja	19	16	15			ja
12	131	DE0948013993	Miller	HL	08/24/16	Fidelio	rbt	0	Novaderma	D	2	08/12/16	15	nein	31	31	30			nein
13	116	DE0945138279	Miller	HR	08/24/16	Lichtold	rbt	3	MH	A	4	03/24/16	150	nein	27	22	20			ja
14	82	DE0948013962	Miller	HL	08/24/16	Goldfieber	sbt	3	MH_CTC	E	2	05/20/16	95	nein	41	35	33			ja
15	170	DE0947039632	Miller	HL	08/24/16	Rias	rbt	3	Cyclo	B	3	08/15/16	10	nein	32	36	33			ja
16	126	DE0947039639	Miller	HR	08/24/16	Desk	rbt	3	MH	A	3	06/22/16	60	nein	50	43	34			ja
17	33	DE0948013990	Miller	HL	08/24/16	Magnum	sbt	0	Novaderma	D	2	07/10/16	45	nein	26	0	0	09/08/16	Bein_gebrochen	nein
18	118	DE0945287738	Miller	HR	08/24/16	Renegade	rbt	3	Repiderma	C	3	01/02/16	240	nein	32	24	22			ja
19	124	DE0947039592	Miller	HL	08/24/16	Sterngold	sbt	3	MH_CTC	E	2	07/24/15	395	ja	18	12	0			ja
20	43	DE0948014047	Miller	HL	08/24/16	Aragorn	rbt	2	Cyclo	B	1	10/14/15	310	ja	17	0	24			ja

Tabelle 16: Beispielhafte Datenerfassung sowohl der Auswertung der HE-Präparate, als auch der versilberten Probenschnitte

	Hematoxylin_Eosin												
Idcode	Barrier_I_vorhanden	Barrier_I_kontinuierlich_intakt	Barrier_I_eben	Barrier_I_Dicke_physiologisch_25_30_µm	Barrier_I_orthokeratotisch	Barrier_II_intakt	Barrier_II_Dicke_physiologisch_100_150_µm	Barrier_II_orthokeratotisch	Barrier_III_vorhanden	Barrier_III_kontinuierlich_intakt	Inflammation	perivaskuläre_Infiltration	Proliferation_Mitotic activity
Number	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no_plus	yes_no	yes_no	yes_no_plus	yes_no	yes_no	yes_no	acute_chronic	normal_plus	normal_high
1	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	high
2	yes	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	high
3	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	normal
4	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	normal	high
5	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	normal
6	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	high
7	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	normal
8	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	normal
9	no	no	no	no	no	no	no	no	yes	no	acute	plus	normal
10	yes	no	no	no	no	no	plus	no	yes	yes	acute	plus	high

	Warthin_Starry_Versilberung										
	spiralisierte_Spirochetes					encysted_Spirochetes					
Idcode	in_SC	SG_and_SSp	bis_SB	Papillary_der_mis	Reticular_der_mis	in_SC	SG_and_SSp	bis_SB	Papillary_der_mis	Reticular_der_mis	Comments
Number	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	yes_no	
1	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
2	yes	yes	yes	yes	no	yes	yes	yes	no	no	
3	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
4	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
5	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
6	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
7	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
8	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
9	nb	yes	yes	yes	no	nb	yes	yes	yes	no	
10	yes	yes	yes	yes	no	yes	yes	yes	yes	no	





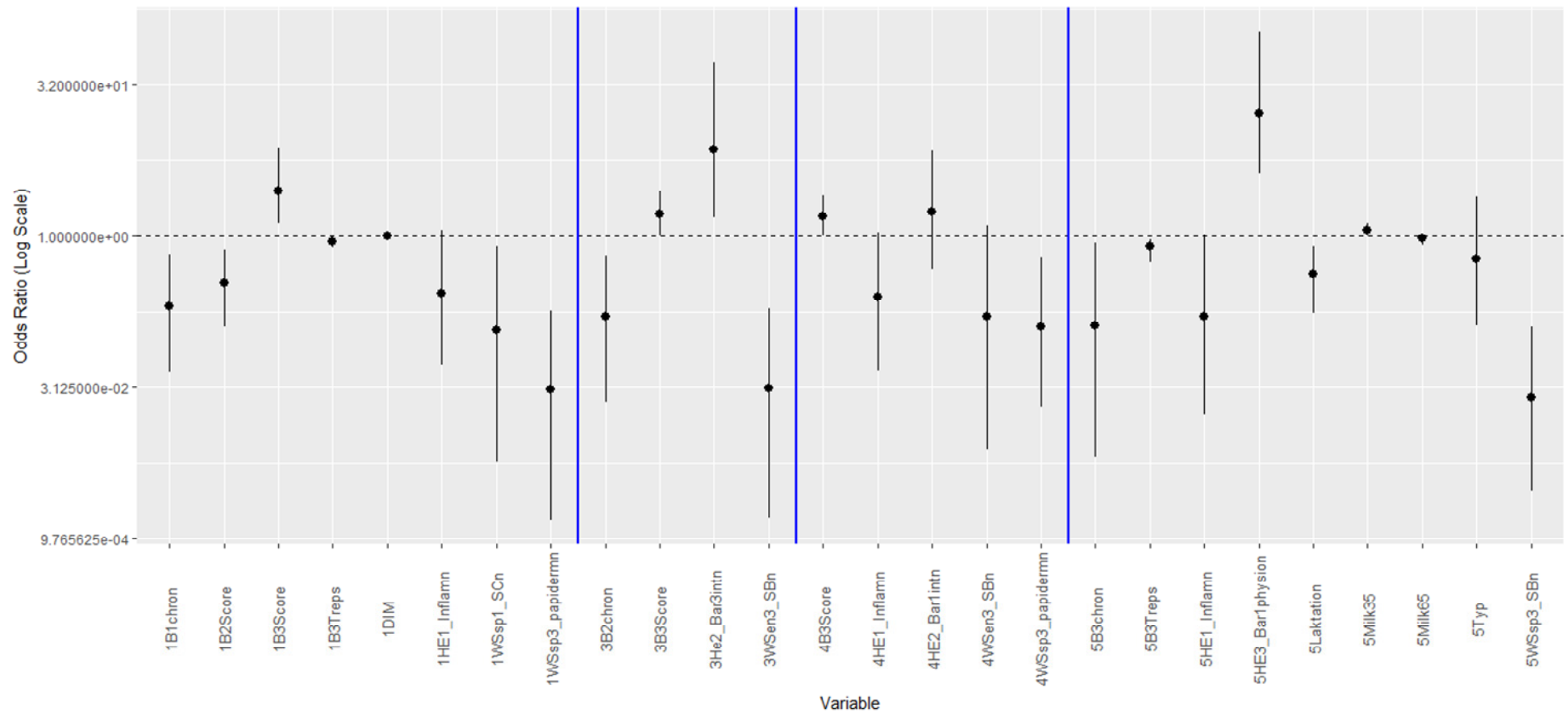


Abbildung 62: Graphische Darstellung der adjusted Odds Ratios in einem Forest plot für die statistisch signifikanten Parameter aus den Vergleichen der Gruppe A gegen Gruppe B (1), Gruppe C gegen Gruppe B (3), Gruppe D gegen Gruppe B (4), Gruppe E gegen Gruppe B (5)

Beispiel 1: Kartierung pro Kuh zur direkten Beurteilung des Heilungsverlaufs

KUH 67 (471), HR, Repiderma



Tag 1



Tag 4



Tag 14



Tag 28

Beispiel 2: Kartierung pro Kuh zur direkten Beurteilung des Heilungsverlaufs

KUH 68 (479), HL, MH+CTC



Tag 1



Tag 14



Tag 28



Tag 44

Beispiel 3: Kartierung pro Kuh zur direkten Beurteilung des Heilungsverlaufs

KUH 69 (405), HR, MH



Tag 1



Tag 14



Tag 28



Tag 44

Beispiel 4: Kartierung pro Kuh zur direkten Beurteilung des Heilungsverlaufs

KUH 70 (454), HR, Cyclo



Tag 1



Tag 2



Tag 14



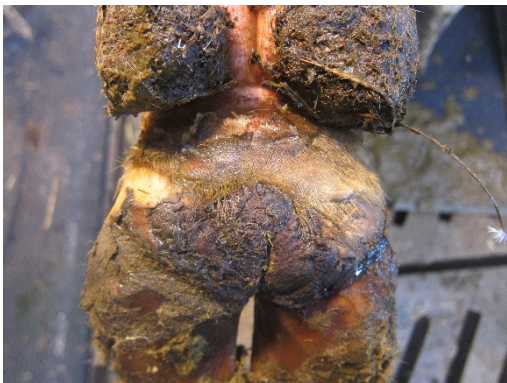
Tag 28

Beispiel 5: Kartierung pro Kuh zur direkten Beurteilung des Heilungsverlaufs

KUH 34 (446) HL, Novaderma



Tag 1



Tag 5



Tag 14



Tag 28

12 Literaturverzeichnis

- 1 Allen, J., Anderson, S., Collier, R. und Smith, J. (2013): Managing heat stress and its impact on cow behavior. 28th Annual Southwest Nutrition and Management Conference.
- 2 Alsaaod, M. und Büscher, W. (2009): Früherkennung von Lahmheit bei Milchkühen mit elektronischen Aktivitätssensoren. LANDTECHNIK–Agricultural Engineering 64(6): 413-416.
- 3 Anklam, K., Kulow, M., Yamazaki, W. und Doepfer, D. (2017): Development of real-time PCR and loopmediated isothermal amplification (LAMP) assays for the differential detection of digital dermatitis associated treponemes. PLOS ONE 12(5): 13.
- 4 Berry, S. L., Read, D. H., Walker, R. L. und Famula, T. R. (2010): Clinical, histologic, and bacteriologic findings in dairy cows with digital dermatitis (footwarts) one month after topical treatment with lincomycin hydrochloride or oxytetracycline hydrochloride. Journal of the American Veterinary Medical Association 237(5): 555-560.
- 5 Bleuel, J. E. (2010): Erhebungen zum Arzneimiteleinsatz in bayerischen Milchkuhhaltungen unter Berücksichtigung betrieblicher Gegebenheiten. Imu.
- 6 Blowey, R., Bell, J. und Evans, N. (2017): PCR Detection Of Digital Dermatitis Treponemes Within Cattle Footprints And On Equipment Surfaces. Lameness in Ruminants, Munich.
- 7 Borkert, J., Galleguillos, F. und Sandoval, C. (2013): Histopathology from samples collected from different claw lesions of five lame cows from one herd in southern Chile. Lameness in ruminants, Bristol.
- 8 Brandt, S., Sykora, S., Ollhoff, D., Research Group Oncology, E. C. und Veterinary University of Vienna, A. (2016): Identification of BDD-associated treponemes in Brazilian cattle. World Buiatrics Congress, Dublin.
- 9 Bronsema, H., Stratmann, J., Schlosser, K. und Theuvsen, L. (2014): Wachstumsstrategien Von Familiengeführten Milchviehbetrieben Mit Fremdarbeitskräften. 54th Annual Conference, Goettingen, Germany, September 17-19, 2014, German Association of Agricultural Economists (GEWISOLA).
- 10 Brummelman, B., Baerveldt, J. und Holzhauer, M. (2013): Treatment of claw disorders in the veterinary practice. Lameness in ruminants, Bristol.
- 11 Bryan, J. (2004): Moist wound healing, a concept that changed our practice. J Wound Care 13: 227-228.

-
- 12 Capion, N., Larsson, E. K. und Nielsen, O. L. (2018): A clinical and histopathological comparison of the effectiveness of salicylic acid to a compound of inorganic acids for the treatment of digital dermatitis in cattle. *J Dairy Sci* 101(2): 1325-1333.
 - 13 Capion, N., Nielen, O. und Larsson, E. (2013): Treatment effect of Agron and salicylic acid on digital dermatitis-preliminary results. *Lameness in ruminants*, Bristol.
 - 14 Carter, S. (2016): A reverse vaccinology approach to developing a vaccine for digital dermatitis. . *World Buiatrics Congress*, Dublin.
 - 15 Chee-Sanford, J., Aminov, R., Krapac, I., Garrigues-Jeanjean, N. und Mackie, R. (2001): Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 67: 1494–1502
 - 16 Cheli, R. und Mortellaro, C. (1974): La dermatite digitale del bovino 8th International Conference on Diseases of Cattle, Milan.
 - 17 Choi, B. K., Natterma, H., Grund, S., Haider, W. und Gobel, B. (1997): Spirochetes from Digital Dermatitis Lesions in Cattle Are Closely Related to Treponemes Associated with Human Periodontitis *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* 47(1): 175-181.
 - 18 Coatney, J., Shearer, J., Krull, A., Gorden, P. und Plummer, P. (2017): Prospective Randomized Clinical Trial Comparing Therapeutic Interventions for Complete Healing of Advanced Bovine Digital Dermatitis Lesions in Dairy Cows. *Lameness in Ruminants*, Munich.
 - 19 Cornelisse, J., van Asten, A. und ter Huurne, A. (1997): Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *The veterinary record* 140: 620-623.
 - 20 Cramer, G. und Johnson, R. (2015): Evaluation of Risks of Violative Milk Residues Following Extra Label Topical Administration of tetracycline for Digital Dermatitis in Dairy Cattle *Lameness in ruminants*, Valdivia.
 - 21 Cramer, G., Lissemore, K. D., Guard, C. L., Leslie, K. E. und Kelton, D. F. (2008): Herd- and Cow-Level Prevalence of Foot Lesions in Ontario Dairy Cattle. *Journal of dairy science* 91: 3888-3895.
 - 22 Cramer, G., Winders, T., Solano, L. und Kleinschmit, D. (2018): Evaluation of agreement among digital dermatitis scoring methods in the milking parlor, pen, and hoof trimming chute *Journal of dairy science*: 9.
 - 23 Cutler, J. H., Cramer, G., Walter, J., Millman, S. und Kelton, D. (2013): Randomized clinical trial of tetracycline hydrochloride bandage and paste

-
- treatments for resolution of lesions and pain associated with digital dermatitis in dairy cattle. *Journal of dairy science* 96(12): 7550-7557.
- 24 Doepfer, D. (2009): The dynamics of digital dermatitis in dairy cattle and the manageable state of disease Alberta and British Columbia Veterinarians Plan Hoof Health Symposium. Banff.
- 25 Doepfer, D., Desranleaux Dandurand, U., Desrochers, A., Letellier, A., Quessy, S., Bourgeois, A., Frenette Dussault, C. und Allard, M. (2013): Comparison of hoof bath solutions for the prevention and control of digital dermatitis in dairy cows. *Lameness in ruminants*, Bristol.
- 26 Doepfer, D., Holzhauer, M. und van Boven, M. (2012): The dynamics of digital dermatitis in populations of dairy cattle: Model-based estimates of transition rates and implications of control. *The Veterinary Journal* 193: 648-653.
- 27 Dopfer, D. (1994): Epidemiological investigations of digital dermatitis on two dairy farms.
- 28 Dopfer, D., Koopmans, A., Meijer, F. A., Szaka1ll, I., Schukken, Y. H., Klee, W., Bosma, R. B., Cornelisse, J. L. und van Asten, A. J. A. M. t. H., A A H M (1997): Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *The Veterinary Record* 140: 620-623.
- 29 Dyson, S., Armstrong, T., Allen, T., Allen, N., Davies, A. und Bell, N. (2013): Suspected chemical burn on the digital skin of dairy cows following foot bathing with 5% formalin solution. *Lameness in ruminants*, Bristol.
- 30 Ebert, I., Amato, R., Hein, A. und Konradi, S. (2014): Eintrag von AB über Gülle in die Umwelt, Arzneimittel in der Umwelt - vermeiden, reduzieren, überwachen. Dessau-Roßlau, Umweltbundesamt, Fachgebiet IV 2.2 Arzneimittel, Wasch- und Reinigungsmittel.
- 31 Egger-Danner, C., Nielsen, P., Fiedler, A., Müller, K., Fjeldaas, T., Döpfer, D., Daniel, V., Bergsten, C., Cramer, G., Christen, A.-M., Stock, V., Thomas, G., Holzhauer, M., Steiner, A., Clarke, J., Capion, N., Charfeddine, N., Pryce, J. E., Oakes, E., Burgstaller, J., Heringstad, B., Ødegård, C., Kofler, J., Egger, F. und Cole, J. B. (2015): ICAR Claw Health Atlas. ICAR.
- 32 Eiberle, J. (2010): Vergleichende Untersuchung der proximalen Paravertebralanästhesie und der modifizierten Schnitlinieninfiltration beim Rind. Imu.
- 33 Esch, M. (2004): Untersuchungen zur Wirksamkeit eines Poly-Vinyl-Pyrrolidon (PVP)–Jodkomplexes zur Behandlung der Dermatitis digitalis (Dd) und zum Bewegungsverhalten von an Dd erkrankten Milchkühen. Imu.
- 34 Evans, N., Murray, R. und Carter, S. (2016): Bovine digital dermatitis: Current concepts from laboratory to farm. *The Veterinary Journal* 211: 3-13.

-
- 35 Evans, N., Timofte, D., Carter, S., Brown, J., Scholey, R., Read, D. und Blowey, R. (2010): Association of treponemes with bovine ulcerative mammary dermatitis. *Veterinary Record*: 532-3.
- 36 Fiedler, A. (2012): Funktionelle Klauenpflege als Grundlage der tierärztlichen Diagnostik und Therapie. *Der Praktische Tierarzt* 93(1): 26.
- 37 Fiedler, A., Haas, J., Hoefler, R., Kellhuber, H., Moosbauer, M., Warmedinger, H., Doepfer, D. und Maierl, J. (2013a): Polyurethane Wound Dressing on Digital Dermatitis. *Lameness in ruminants*, Bristol.
- 38 Fiedler, A., Maierl, J., Doepfer, D., Eise, M., Shao, S. und Kuechenhoff, H. (2013b): Efficacy of a Biocidal Product in Foot Bathing. *Lameness in ruminants*, Bristol.
- 39 Fiedler, A., Nüske, S. und Maierl, J. (2000): Funktionelle Klauenpflege beim Rind. *blv*.
- 40 Fiedler, A., Sauter-Louis, C. und Maierl, J. (2015): Polyurethane dressing, tetracycline and salicylic acid use for treatment of digital dermatitis in cattle. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 43(6): 350-358.
- 41 Geldhof, J., Bergsten, C., Blowey, R., Capion, N., Fiedler, A., Holzhauer, M., Kloosterman, P., Relun, A., Hemling, T., Lopez, M. und Van Acker, J. (2017): 5 Point Plan For Control Of Digital Dermatitis. *Lameness in Ruminants*, Munich.
- 42 Gomez, A., Bernardoni, N., Rieman, J., Dusick, A., Hartshorn, R., Read, D., Socha, M., Cook, N. und Döpfer, D. (2014): A randomized trial to evaluate the effect of a trace mineral premix on the incidence of active digital dermatitis lesions in cattle. *Journal of dairy science* 97(10): 6211–6222
- 43 Gomez, A., Cook, N., Bernardoni, N., Rieman, J., Dusick, A., Hartshorn, R., Socha, M., Read, D. und Döpfer, D. (2012): An experimental infection model to induce digital dermatitis infection in cattle. *Journal of dairy science* 95(4): 1821-1830.
- 44 Grimes, J. D. (2006): Koch's Postulates—Then and Now *Microbe Magazine*: 223-228.
- 45 Hagen, J. und Mülling, C. (2012): Klauenerkrankungen: Risiken und Prävention. *Der Praktische Tierarzt* 93(1): 11.
- 46 Hara-Kudo, Y., Nemoto, J., Ohtsuka, K., Segawa, Y., Takatori, K., Kojima, T. und Ikedo, M. (2007): Sensitive and rapid detection of Vero toxin-producing *Escherichia coli* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Medical Microbiology* 56(3): 398-406.

-
- 47 Hemling, T. C. (2017): Meta-Analysis DD Intervention Trials: International Lameness Abstracts. Lameness in Ruminants, Munich.
- 48 Holzhauer, M., Bartels, C., Van Barneveld, M., Volders, C. und Lam, T. (2011): Curative effect of topical treatment of digital dermatitis with a gel containing activated copper and zinc chelate. The Veterinary Record 169(21): 555.
- 49 Holzhauer, M., Ploegmakers-van Deventer, R., Smits, D. und Swart, W. (2017a): Comparing the curative efficacy of topical treatment with thiamphenicol and oxytetracycline on digital dermatitis lesions in dairy cattle. Veterinary Record: 4.
- 50 Holzhauer, M., van Deventer, R., Smits, D. und Swart, W. (2017b): Comparison Of Topical Thiamphenicol Vs. Oxytetracycline Treatment On Cure Of Digital Dermatitis In Dairy Cattle. Lameness in Ruminants, Munich.
- 51 James, G., Witten, D., Trevor Hastie, T. und Tibshirani, R. (2015): An Introduction to Statistical Learning. Springer.
- 52 Jansen, R. H. P. H. M., de Pont, E. T. F. P., Verbruggen, T., Verstijnen, C. W. und van den Borne, J. J. G. C. (2017): Developing And Testing A Novel Integrative Approach Without Antibiotics For Reducing Claw Health Problems In Dairy Cows. Lameness in Ruminants, Munich.
- 53 Jennings, C., Seijers, M., Doherty, S. und O'Connell, N. (2013): Farmers favorite footbaths additives. Lameness in ruminants, Bristol.
- 54 Jorritsma, R., Dotinga, A., Lammers, G. und Nielen, M. (2016): A randomised clinical trial on the effect of antibiotic or non-antibiotic topical treatment of digital dermatitis in dairy cattle World Buiatrics Congress, Dublin.
- 55 Kist, S. M. (2016): Untersuchung der klinischen und röntgenologischen Erfolgsrate sowie der antimikrobiellen Wirkung von Ozongas bei apikaler Parodontitis im Vergleich zu einem Standarddesinfektionsprotokoll–eine randomisierte, kontrollierte, klinische Studie. LMU München, München.
- 56 Klawitter, M., Döpfer, D., Braden, T. und Müller, K. E. (2016): To bandage or not bandage: The curative effect of bandaging digital dermatitis lesions. World buiatric Congress, Dublin.
- 57 Kleiminger, E. (2012): Klauenbäder unter rechtlichen Aspekten. Tierärztliche Praxis Großtiere 2(2012).
- 58 Klitgaard, K., Boye, M., Capiion, N. und Jensen, T. K. (2008): Evidence of multiple Treponema phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. J Clin Microbiol 46: 3012-3020.
- 59 Kofler, J., Innerebner, C., Pesenhofer, R., Hangl, A. und Tichy, A. (2014): Effectiveness of salicylic acid paste for treatment of digital dermatitis in dairy

-
- cows compared with tetracycline spray and hydrotherapy. *Berliner und Muenchener tieraerztliche Wochenschrift* 128(7-8): 326-334.
- 60 Koopmann, R. (2005): Tierbehandlungen im Ökolandbau - ein besonderes Problem? *Deutsches Tierärzteblatt* 53(8): 860-865.
- 61 Krull, A., Shearer, J., Gorden, P., Scott, H. und Plummer, P. (2016): Digital dermatitis: Natural lesion progression and regression in Holstein dairy cattle over 3 years *Journal of dairy science* 99: 3718–3731.
- 62 Krull, A. C., Shearer, J. K., Gorden, P. J., Cooper, V. L., Phillips, G. J. und Plummer, P. J. (2014): Deep sequencing analysis reveals temporal microbiota changes associated with development of bovine digital dermatitis. *Infection and immunity* 82(8): 3359-3373.
- 63 Kulow, M., Anklam, K. und Döpfer, D. (2017): Evaluation Of Clinical Stages Of Digital Dermatitis In Beef Cattle Trough Histological Examination And Determination Of Risk Factors For Spirochetal Skin Invasion. *Lameness in Ruminants*, Munich.
- 64 Lammers, G., Sabau, E., van Berkel, R., van der Vegt, H., Vulders, C. und Vis, K. (2016): A Randomized Controlled Trial Of 50 M2 Digital Dermatitis Lesions With A Non-Antibiotic Gel Containing Chelated Copper And Zinc *World Buiatrics Congress*, Dublin.
- 65 Lang, G. (2013): *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer, Wien.
- 66 Laven, R. A. und Hunt, H. (2002): The efficacy of non-antibiotic foot-baths in the control of digital dermatitis in the UK. *12th International Symposium on Lameness in Ruminants*. J. K. Shearer. Orlando, Florida, USA: 366-367.
- 67 Maier, S., Fiedler, A., Maierl, J. und Haidn, B. (2013): Einsatz einer Klauenwaschanlage unter Beurteilung der Reinigungswirkung, des Tierverhaltens und der Waschwasserqualität. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 41(1): 20-30.
- 68 Manske, T., Hultgren, J. und Bergsten, C. (2002): Topical treatment of digital dermatitis associated with severe heel-horn erosion in a Swedish dairy herd. *Preventive veterinary medicine* 53(3): 215-231.
- 69 Marcatili, P., Nielsen, M. W., Sicheritz-Pontén, T., Jensen, T. K., Schafer-Nielsen, C., Boye, M., Nielsen, M. und Klitgaard, K. (2016): A novel approach to probe host-pathogen interactions of bovine digital dermatitis, a model of a complex polymicrobial infection. *BMC Genomics* 17: 13.
- 70 Merkatoris, P., Kulow, M. und Döpfer, D. (2017): Activity Of Beef Cattle Affected By Digital Dermatitis Compared To Healthy Cattle. *Lameness in Ruminants*, Munich.

-
- 71 Miguel-Pachecco, G., Huxley, J. und Kaler, J. (2013): To go or not to go: Impact of lameness in dairy cows on visits to an Automatic Milking System. Lameness in ruminants, Bristol.
- 72 Muller, E., Al-Attar, J., Wolff, A. und Farber, B. (1998): Mechanism of Salicylate-Mediated Inhibition of Biofilm in *Staphylococcus epidermidis*. The Journal of Infectious Diseases 177: 501-3.
- 73 Nagarajan, R., Scutari, M. und Lebre, S. (2013): Bayesian Networks in R Springer.
- 74 NAV (2017): Nomina Anatomica Veterinaria. International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, Hannover, Ghent, Columbia, Rio de Janeiro.
- 75 Oliveira, V., Sørensen, J. und Thomsen, P. (2017): Assessing Farmer Detection Of Digital Dermatitis In Danish Dairy Herds. Lameness in Ruminants, Munich.
- 76 Otto, S. und Day, T. (2007): A Biologist's Guide to Mathematical Modeling in Ecology and Evolution. Princeton University Press, Princeton.
- 77 Pavlenko, A., Bergsten, C., Ekesbo, I., Kaart, T., Aland, A. und Lidfors, L. (2011): Influence of digital dermatitis and sole ulcer on dairy cow behaviour and milk production. animal 5(08): 1259-1269.
- 78 Pschyrembel, W., Dornblüth, O., Zink, C. und Hildebrandt, H. (1994): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin.
- 79 R Core Team (2017): A language and environment for statistical computing. from <https://www.R-project.org/>.
- 80 Radolf, J. (1996): Treponema In: S. Baron, Medical Microbiology, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston: S.
- 81 Raundal, P., Forkman, B., Herskin, M., Munksgaard, L. und Andersen, P. (2017): NSAID Reduces Lameness Score Without Affecting Lying Behaviour Of Lam Dairy Cows. Lameness in Ruminants, Munich.
- 82 Read, D. H. und Walker, R. L. (1998): Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle: clinical and gross pathologic findings. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 10(1): 67-76.
- 83 Relun, A., Grand, B., Heily, V., Denis, G., Tocze, C., Dorso, L., Assié, S., Fusellier, M., Douart, A. und Guatteo, R. (2017): Outbreaks Of Digital Dermatitis In Beef Fattening Units: Clinical Findings And Control. Lameness in Ruminants, Munich.

-
- 84 Riedel, S. (2003): Vergleichende Untersuchungen zur dermalen Penetration und Permeation in Diffusionszellen. PhD thesis Tierärztliche Hochschule Hannover.
- 85 Riegler, M. (2014): Klinische Studie zur Therapie der Dermatitis digitalis: einmalige parenterale Injektion eines Depotpräparates mit dem Wirkstoff Ceftiofur vs. lokale Applikation eines Chlortetracyklin-haltigen Sprays.
- 86 Roberts, M., Chung, W. und Roe, D. (1996): Characterization of Tetracycline and Erythromycin Resistance Determinants in *Treponema denticola*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 40: 1690–1694.
- 87 Ruggeri, F., Faltin, F. und Kenett, R. (2007): Bayesian Networks. In: W. Sons, *Encyclopedia of Statistics in Quality and Reliability*: S.
- 88 Schlafer, S. (2012): Die Beteiligung ausgewählter putativer Pathogene an Parodontitis und boviner Dermatitis digitalis: molekulare Epidemiologie und räumliche Verteilung in Biofilmen. Medizinische Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin.
- 89 Scholey, R., Evans, N., Blowey, R., Massey, J., Murray, R., Smith, R., Ollier, W. und Carter, S. (2013): The potential role of gene regulation in the control of bovine digital dermatitis. *Lameness in Ruminants*, Bristol.
- 90 Schöpke, K., Gomez, A., Dunbar, K., Swalve, H. und Döpfer, D. (2015): Investigating the genetic background of bovine digital dermatitis using improved definitions of clinical status. *Journal of Dairy Science* 98(11): 8164-8174.
- 91 Schraner, A. (2015): Prävalenzen von Lahmheiten bei Milchkühen in niedersächsischen Milchviehbetrieben. Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- 92 Schultz, N. und Capion, N. (2013): Efficacy of salicylic acid in the treatment of digital dermatitis in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 198(2): 518-523.
- 93 Sekul, W. (2017): Comparison Of Treatment Of Digital Dermatitis With Two Antibiotic And Two Non-Antibiotic Products. *Lameness in Ruminants*, Munich.
- 94 Sellera, F., Gargano, R., Barbosa, B., Anjos, C., Lopes, L., Ollhoff, R., Sá, L., Ribeiro, M., Baptista, M. und Pogliani, F. (2017): Antimicrobial Photodynamic Therapy For Digital Dermatitis. *Lameness in Ruminants*, Munich.
- 95 Seymour, J., Durkin, J., Bathina, H. und Hemling, T. (2000): Footbathing in the management of digital dermatitis. 12th International Symposium on Lameness in Ruminants. J. K. Shearer. Orlando, Florida, USA: 374-376.
- 96 Shearer, J. K., Plummer, P. J. und Schleining, J. A. (2015): Perspectives on the treatment of claw lesions in cattle. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 6: 273.

-
- 97 Shearer, J. K., Stock, M. L., Van Amstel, S. R. und Coetzee, J. F. (2013): Assessment and management of pain associated with lameness in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 29(1): 135-156.
- 98 Silbernagl, N. (2012): Einfluss einer Klauenwaschanlage auf die Klauengesundheit einer Milchviehherde. München, Ludwig-Maximilians-Universität, Diss., 2012.
- 99 Sprecher, D., Hostetler, D. und Kaneene, J. (1997): A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. *Theriogenology* 47(6): 1179-1187.
- 100 Stock, K. und Agena, D. (2012): Das GKuh-Projekt aus Sicht der Zuchtwertschätzung erste Zuchtwerte für Gesundheitsmerkmale. . GKuh-Workshop. Osnabrück.
- 101 Tousaaint Raven, E. (1998): Klauenpflege beim Rind. Universität Utrecht, Deutsche Übersetzung durch Döpfer, D.
- 102 Tremblay, M., Bennett, T. und Döpfer, D. (2016): The DD Check App for prevention and control of digital dermatitis in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 132: 1-13.
- 103 Vermunt, J. und Greenough, P. (1997): Management and control of claw lameness – an overview. *Lameness in cattle*: 308-315.
- 104 Weigele, H., Gygax, L., Steiner, A., Wechsler, B. und Burla, J. (2018): Moderate lameness leads to marked behavioral changes in dairy cows. *Journal of dairy science*: 13.
- 105 Werven van, T., Wilmink, J., Sietsma, S. und Nielen, M. (2016): Efficacy of Topical Treatment of Udder Cleft Dermatitis World Buiatric Congress, Dublin.
- 106 Wiedenhöft, D. (2005): Einfluss von Lahmheiten auf die Fruchtbarkeitsleistung von Milchkühen. Tierärztliche Hochschule Hannover Hannover.
- 107 Wilson-Welder, J., Alt, D. und Nally, J. (2015a): The etiology of digital dermatitis in ruminants: recent perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports* 6: 155–16.
- 108 Wilson-Welder, J. H., Alt, D. P. und Nally, J. E. (2015b): Digital Dermatitis in Cattle: Current Bacterial and Immunological Findings. *Animals* 5(4): 1114-1135.

Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Johann Maierl für die Annahme dieses Themas, der fortwährenden Unterstützung sowie Korrektur dieser Arbeit danken.

Mit der Hilfe von Frau Prof. Dr. Dörte Döpfer erhielt das Projekt die erste Struktur, und den roten Faden bis zur statistischen Auswertung der fertigen Daten. Ihr danke ich für unermüdlichen Optimismus, Ehrlichkeit und das Teilen ihres grossen Wissensschatzes. Ihr Team an der Universität in Madison, Wisconsin hat mich bei allen Fragen immer unterstützt und mir die Welt zu ihrem Labor und der statistischen Bearbeitung von Fragestellungen eröffnet.

Prof. Dr. Dr. Eva Zeiler hat geholfen, das Projekt aus den Kinderschuhen zu einer umfassenden Studie heranwachsen zu lassen.

Dem Bayrischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten danke ich besonders für die Finanzierung der Arbeit und die durchweg gute Zusammenarbeit.

Für viele Stunden am späten Nachmittag in der Pathologie, gefüllt mit Erklärungen, der Erarbeitung von Schemata zur Evaluierung des Heilungsprozesses der Haut und fröhlichen Stunden danke ich Dr. Monir Majzoub-Altweck. Seine beiden Mitarbeiterinnen Frau Schöl und Frau Mair teilten auf ihre herzliche Art ihr immenses Wissen zur Elektronenrastermikroskopie.

Die gemeinsame Einarbeitung in die histologische Betrachtung der Treponemen mit Prof. Dr. Christoph Mülling an der Universität in Leipzig hat mir einen neuen Horizont eröffnet.

PD Dr. Sven Reese danke ich für den fortwährenden Austausch über den fachlichen Hintergrund der Arbeit, die stete Bereitschaft aufkommende Probleme im Keim zu ersticken und viele Stunden am Elmi für eine gute Aufnahme zu verbringen.

Den beiden Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie Dr. Maximilian Kollmuß und Dr. Stefan Kist für die Offenheit, ein Thema fachübergreifend zu diskutieren, neue Ansätze zu finden und die Erfahrung in der Arbeit mit Treponemen auszutauschen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Populationsgenetik unter Herrn PD Dr. Ivica Medugorac danke ich für ihr kurzfristiges Engagement und der Möglichkeit der DNA-Extraktion aus zuvor fixierten Proben. Hierbei gilt mein besonderer Dank Frau Renate Damian.

Den Firmen Eppendorf, Intracare, Morphisto, MLUA Oranienburg und WDT danke ich für die vielen konstruktiven Gespräche vor dem Beginn der Studie zur Optimierung aller möglichen Arbeitsabläufe.

Besonderer Dank gilt den wohlgesonnenen Mitarbeitern der Anatomie sowie den guten Seelen aus dem Labor- und Präparationstrakt des Instituts für Tieranatomie. Stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung in der Laborarbeit besonders von Frau Silvia Mitterer und immer ein freundliches Wort erleichterten die erfolgreiche Fertigstellung der Arbeit erheblich. Danke auch an Anke, dass sich immer ein guter Grund finden ließ, um an die frische Luft zu gehen.

Die tatkräftige sowie geduldige Unterstützung der Klauenpfleger des VGK (Kresimir Basic, Rainer Höfler, Hermann Kellhuber, Markus Stumpf, Herbert Warmedinger) bei der Datenerfassung und der Entnahme der Proben auf den landwirtschaftlichen Betrieben war mir eine großartige Hilfe.

Ohne die unermüdliche Hilfe, das große Vertrauen der Landwirte in mich und die immer köstliche Verpflegung auf den Milchviehbetrieben, wäre diese Studie nicht möglich gewesen. Eine so selbstverständlich erscheinende Zusammenarbeit von Landwirten, Klauenpflegern und Tierärzten hat mich immer wieder in dem Grundgedanken meiner Arbeit bestärkt.

Auch meinen Helfern bei der Probenentnahme gilt mein Dank. Ganz besondere Unterstützung erhielt ich hier von meinen Kolleginnen Frau Dr. Andrea Fiedler und Frau Dr. Katharina Grimm. Zu jeder Zeit kann ich mich auf ihre umsichtige Art, den fachlichen Austausch und ihre Hilfe verlassen. Danke, dass die Zeit nie zu knapp für ein fröhliches Wort ist.

Danke Domi, für dein unerschütterliches Vertrauen in Babotte und Christian für den Bausatz zu einem unbeschwerten Leben.

Hans Haas und seiner Familie danke ich für die herzliche Aufnahme, die fortwährende Unterstützung sowie die Bereitschaft, einem Nordlicht in den hintersten Nischen des Bayrischen Waldes die funktionelle Klauenpflege zu lehren.

Erika danke ich für die vielen, langen Fahrten auf die Studienbetriebe und den unermüdlichen Einsatz, egal was die Witterung oder die geographischen Gegebenheiten uns abverlangten.

Ein besonderer Dank gilt meinem Vater, der diese Arbeit mehrmals gelesen hat, sich von fachfremder Literatur nicht abschrecken ließ und die Geschwindigkeit der Post mit jeder Korrektur auf die Probe stellte.

Ich danke meiner Familie. Nicht nur für die fortwährende Unterstützung in der Zeit der Doktorarbeit. Danke für den starken Rückhalt und das Zuhause, welches ihr mir geschaffen habt. Sören hat liebevoll darauf geachtet, dass ich den Platz am Schreibtisch nicht unnötig verlassen habe. Ein besonderer Dank gilt meiner Oma. In unvergessener Weise hat sie an mich geglaubt und sich über jedes noch so kleine Ereignis mitfreuen können.

Eidesstattliche Erklärung/Decleration Oath

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

I hereby declare, on oath, that I have written the present dissertation by my own and have not used other than the acknowledged resources and aids.

München, den 27.März.2018

-Unterschrift liegt im Original vor-

Charlotte Kröger